

MURIEL MOURÃO VIEIRA

PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DA
GLICERALDEÍDO-3- FOSFATO DESIDROGENASE
DE MÚSCULO DE CAIMAN SP.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

CURITIBA
1983

A meu pai

pelo seu constante
estímulo ao desenvol-
vimento intelectual.

AGRADECIMENTOS

Em especial à Dra. Momoyo Nakano pela orientação, auxílio e apoio prestados na execução desta tese.

Ao Dr. Luís Alberto S. Veiga pelo estímulo e colaboração.

À Dra. Glaci Zancan pelo incentivo, apoio e revisão desta tese.

Ao Dr. Shigehiro Funayama pela revisão da tese e sugestões.

Ao Prof. Manoel Francisco Guimarães pelo auxílio prestado na execução das eletroforeses em gel.

Ao Prof. Guido Ferencz pelo auxílio na obtenção das fotografias.

Ao Dr. Aguinaldo Nascimento pelo auxílio nos experimentos de focalização isoelétrica.

Ao Dr. Omar Crivellaro, pelo auxílio prestado na determinação da composição de aminoácidos.

À Sra. Maria Helena B. Imayuki pela revisão das re-

ferências bibliográficas.

Ao Ronan Figueiredo Vieira, meu esposo, pela colaboração.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR, CNPq e FINEP pelo suporte financeiro.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica da UFPR que direta ou indiretamente contribuíram para tornar possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁGINA
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xiv
Resumo	xvi
1. Introdução	1
1.1. Isolamento da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	3
1.2. Estabilidade da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	4
1.3. Estrutura da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	5
1.3.1. Estrutura primária	5
1.3.2. Estrutura da holoenzima	6
1.3.3. Estrutura da apoenzima	12
1.4. Aminoácidos importantes da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Estudo de modificação química	12
1.4.1. Cisteína	12

	PÁGINA
1.4.2. Lisina	14
1.4.3. Arginina	16
1.4.4. Tirosina	16
1.4.5. Histidina	16
1.5. Estudos sobre a interação do NAD com a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	17
1.5.1. Mecanismo de fixação do NAD	17
1.5.2. Banda de Racker	18
1.6. Reatividade de <i>metade dos sítios</i>	20
1.7. Modificações da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase relacionadas com o envelhecimento	21
1.8. Mecanismo de ação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	23
1.9. Papel metabólico da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	26
1.10. Relação entre estrutura protéica e evolução: contribuição da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	29
2. Materiais e Métodos	35
2.1. Reativos químicos	35
2.2. Preparação do substrato	35
2.3. Determinação da concentração de Gliceraldeído-3-fosfato	36
2.4. Determinação da concentração de NAD e NADH ..	37
2.5. Isolamento e purificação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	37

	PÁGINA
2.5.1. Extração	38
2.5.2. Fracionamento com sulfato de amônio	38
2.5.3. Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50	39
2.6. Determinação da proteína	40
2.7. Medida da atividade enzimática	40
2.8. Unidade de enzima	41
2.9. Eletroforese	41
2.9.1. Eletroforese de zona	41
2.9.2. Eletroforese de disco em gel	42
2.9.3. Eletroforese em gel, em presença de SDS	43
2.10. Determinação do peso molecular	43
2.10.1. Eletroforese em gel, em presença de SDS	43
2.10.2. Filtração em gel sephadex G-150	44
2.11. Ponto isoelétrico da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	45
2.12. Determinação da composição de aminoácidos ..	45
2.13. Preparação da Apogliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	46
2.14. Inativação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase por ATP, a 0°C	46
2.15. Inativação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase por NADH e Gliceraldeído-3-fosfato	47
2.16. Efeito da uréia na inativação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	47
2.17. Titulação dos grupos-SH com Nbs ₂	48
2.17.1. Dosagem dos grupos-SH rápidos	49

	PÁGINA
2.17.2. Dosagem dos grupos-SH totais	49
3. Resultados	50
3.1. Purificação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i>	50
3.2. Homogeneidade	51
3.3. Propriedades óticas e conteúdo de NAD^+	51
3.4. Determinação do peso molecular	52
3.5. Ponto isoelétrico	52
3.6. Composição de aminoácidos	53
3.7. Efeito do pH	53
3.8. Efeito do arseniato sobre a atividade enzimática	54
3.9. Efeito da concentração de Gliceraldeído-3-fosfato. Determinação da constante de Michaelis-Menten	54
3.10. Efeito da concentração de NAD^+ . Determinação da constante de Michaelis-Menten	55
3.11. Efeito inibitório do produto da reação, NADH, sobre a atividade enzimática	55
3.12. Efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i>	55
3.13. Efeito de reagentes sulfidrílicos na atividade da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i>	56
3.14. Inativação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i> por ATP, a 0°C	57

3.15.	Inibição da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i> por 3'-5' AMP _c , 5'-AMP, ADP e ATP	58
3.16.	Titulação dos grupos-SH	58
3.17.	Estabilidade da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i>	59
3.18.	Efeito de 2-Mercaptoetanol e Ditioeritritol na atividade da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i>	59
3.19.	Inativação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i> por NADH, a 37°C	60
3.19.1.	Holoenzima	60
3.19.2.	Apoenzima	61
3.20.	Inativação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i> por Gliceraldeído-3-fosfato a 37°C	62
3.21.	Efeito da uréia na inativação da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i>	63
3.22.	Titulação da apoenzima pela banda de Racker.	64
4.	Discussão	92
5.	Conclusões	108
6.	Referências Bibliográficas	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Eletroforese de disco em gel da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i>	70
2	Eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS, da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i>	71
3	Espectro de absorção ultravioleta da HoloGPDH de músculo de <i>Caiman sp</i>	72
4	Espectro de absorção ultravioleta da ApoGPDH de músculo de <i>Caiman sp</i>	73
5	Determinação do peso molecular da subunidade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i> por eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS	74
6	Peso molecular aparente da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> por filtração em gel sephadex G-150	75
7	Ponto isoelétrico da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i>	76

FIGURA		PÁGINA
8	Efeito do pH na atividade da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i>	77
9	Ativação da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> por arseniato	78
10	Efeito da concentração de G3P sobre a atividade da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> . Determinação da constante de Michaelis-Menten ...	79
11	Efeito da concentração do NAD sobre a atividade da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> . Determinação da constante de Michaelis-Menten ...	80
12	<i>Plot</i> , segundo Lineweaver-Burk, da inibição da atividade da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> por NADH, a pH 8,0 e a 25°C	81
13	Inativação da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> por ATP, a 0°C	82
14	Efeito de ATP, ADP, 5'-AMP e 3'-5'-AMP cíclico sobre a atividade da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i>	83
15	<i>Plots</i> segundo Lineweaver-Burk da inibição da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> por ATP, ADP, 5'-AMP e 3'-5'-AMP cíclico	84
16	Efeito de 2-mercaptoetanol e ditioeritritol na atividade da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i>	85
17	Inativação da HoloGPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> por NADH	86
18	Inativação da ApoGPDH de músculo de <i>Caiman</i>	

FIGURA		PÁGINA
	<i>sp</i> por NADH	87
19	Inativação da HoloGPDH de músculo de <i>Caïman</i> <i>sp</i> por G3P	88
20	Inativação da ApoGPDH de músculo de <i>Caïman</i> <i>sp</i> por G3P	89
21	Efeito da uréia na inativação da GPDH de mús- culo de <i>Caïman sp</i>	90
22	Titulação da ApoGPDH de músculo de <i>Caïman sp</i> pela Banda de Racker	91

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
I	Dados espectrais da Holo e Apogliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i>	65
II	Composição de aminoácidos da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <i>Caiman sp</i>	66
III	Efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> ..	67
IV	Efeito de reagentes sulfidrílicos na atividade da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i>	68
V	Estabilidade da GPDH de músculo de <i>Caiman sp</i> a 37°C, efeito do EDTA na inativação da enzima por NADH	69

LISTA DE ABREVIATURAS

GPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G3P	- Gliceraldeído-3-fosfato
$\text{HAsO}_4^{=}$	- Arseniato
NAD	- β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
ATP	- Adenosina trifosfato
ADP	- Adenosina difosfato
AMP	- Adenosina monofosfato
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
PM	- Peso molecular
K _m	- Constante de Michaelis-Menten
K _i	- Constante de inibição
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
EDTA	- Etileno diaminotetraacetato - sal dissódico
TRIS	- Tris-hidroximetil aminometano
Nbs ₂	- Ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzôico)
TNB ⁻	- Íon tionitrobenzoato
-SH"rápidos"	- Número de grupos-SH determinado por extrapolação no tempo zero da cinética da reação com

Nbs₂, em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 contendo EDTA 1mM.

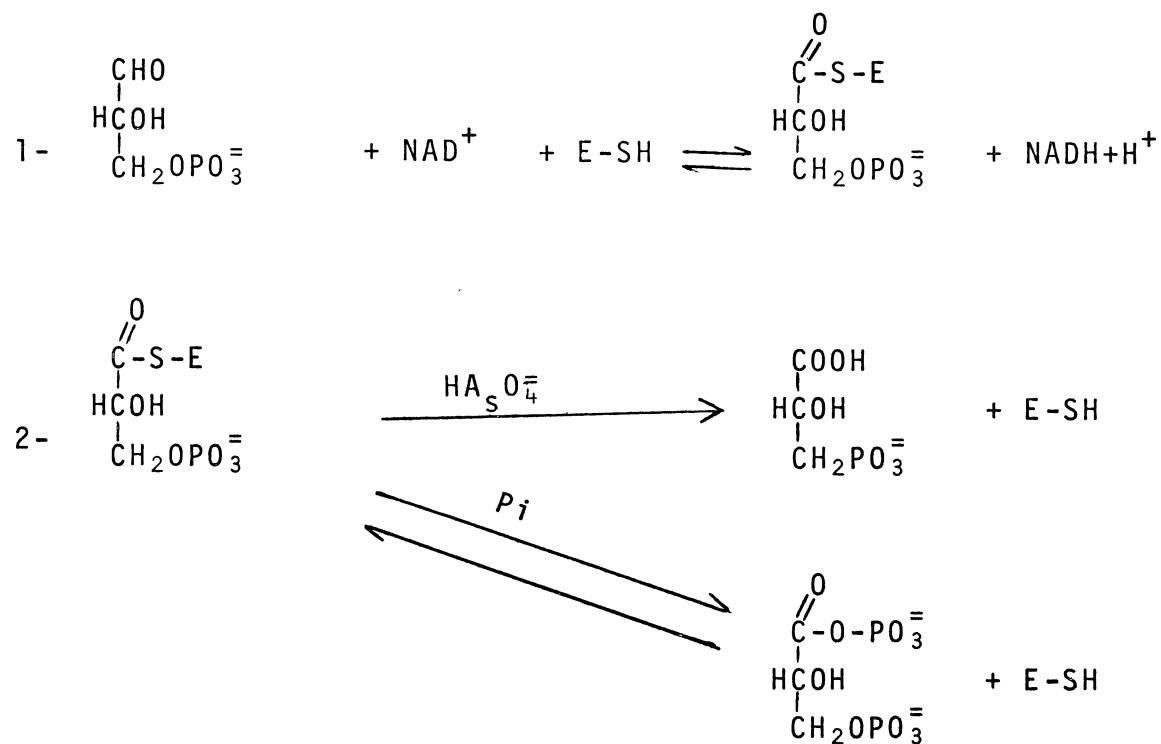
-SH"totais" - Número de grupos-SH da enzima determinado em presença de uréia 8M.

RESUMO

D-Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de *Caiman sp* foi isolada e purificada. O perfil de pH, o ponto isoelétrico, a composição de aminoácidos e as constantes cinéticas foram descritos. Foi demonstrado que a enzima é um tetrâmero com peso molecular de aproximadamente 140.000 daltons. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS demonstrou uma única banda, correspondendo à subunidade, com peso molecular de 36.000. Foi demonstrado que nucleotídeos de adenina inibem competitivamente a atividade enzimática com relação ao NAD. Incubação da enzima com ATP, a 0°C causou perda da atividade enzimática, sendo a mesma parcialmente recuperada por aquecimento à temperatura ambiente. A GPDH é inativada quando incubada em presença de uréia. A reassociação da enzima foi parcial, mesmo em presença de NAD e somente conseguida quando a mesma não estava totalmente dissociada. A GPDH é inativada quando incubada a 37°C em presença de NADH ou gliceraldeído-3-fosfato. Foi demonstrado que NAD não tem qualquer efeito protetor em relação a este tipo de inativação, mas que a presença de 2-mercaptoetanol protege a enzima. A GPDH tem aproximadamente 13,8 grupos-SH por mol dos quais 4 são mais reativos, correspondendo aos grupos-SH do sítio ativo. Através de estudos de fixação do NAD sobre a apoenzima, foi verificado que 4 moles de NAD podem ser ligados por mol de enzima. Os resultados obtidos para a GPDH de músculo de *Caiman sp* demonstram que esta enzima se assemelha mais às enzimas de músculo do que às enzimas de levedura ou bactérias.

1. INTRODUÇÃO

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (D-gliceraldeído-3-fosfato: NAD oxidoreductase), E.C.1.2.1.12, é uma enzima glicolítica que catalisa a oxidação fosforilativa de D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em ácido 1,3- difosfoglicérico. Segundo VELICK & FURFINE¹⁹³ a reação ocorre em duas etapas:



Na primeira etapa da reação, o aldeído e o NAD^+ reagem estequiometricamente com a enzima dando como intermediário acil-enzima, que é desacilada na segunda etapa, pelo arseniato ou fosfato, liberando ácido carboxílico ou acil-fosfato, respectivamente.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH) é uma enzima chave na conversão glicolítica de glucose a ácido pirúvico, que representa uma importante via do metabolismo de carboidratos na maioria dos organismos.

A oxidação de G3P acoplada à fosforilação de nucleotídeos de adenina foi originariamente estabelecida por NEEDHAM & PILLAI¹³⁶. O isolamento desta enzima foi conseguido a partir das observações de GREEN et al.⁷³ em relação à inibição da glicólise e da fermentação alcoólica por ácidos halogenacéticos e pelo trabalho subsequente de RAPKINE¹⁵² associando esta inibição a grupos sulfidrílicos da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. A natureza precisa da reação enzimática foi elucidada por WARBURG & CHRISTIAN * citado por HARRIS, J.J. & WATERS, M.⁸⁶ quando isolaram a GPDH de levedura em forma pura, cristalina. Posteriormente foi descrito o isolamento da enzima cristalina de músculo esquelético de coelho por CAPUTTO & DIXON²⁵ e por CORI et al.^{38, 39}

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ocorre larga

*WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. Isolation and crystallization of protein of the oxidative fermentation enzymes. Biochem. Z., 303:40-68, 1939.

e abundantemente na natureza, compreendendo cerca de 20% da proteína total solúvel em levedura¹⁰⁵ e acima de 10% da proteína solúvel de músculo³⁹.

1.1. ISOLAMENTO DA GPDH

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase tem sido isolada de diferentes fontes, tais como: músculo de coelho^{25, 39}, levedura¹⁰⁵, músculo⁵⁷ e fígado⁴¹ de porco, músculo humano, de boi, de galinha, de peru, de faisão, de esturjão, de lagosta³, músculo de peixe^{74, 100}, de rato¹³⁴, bactérias^{8, 9, 40, 42, 43, 64, 87, 183, 184}, insetos²⁷, protozoários⁷⁵, plantas^{53, 126, 162, 176, 204}, eritrócitos⁵⁵ e algas^{88, 109}.

Os métodos de purificação geralmente relacionam-se com a solubilidade da enzima como complexo enzima-NAD⁺ em altas concentrações de sulfato de amônio. Assim a enzima de músculo de vários animais, onde ela constitui de 5 a 10% da proteína total pode ser obtida a partir de extrato de músculo, por cristalização direta através de simples fracionamento com sulfato de amônio³. Entretanto em outros tecidos a concentração da enzima é muito mais baixa e sua purificação requer vários passos de fracionamento^{99, 111}.

Em bactérias^{43, 183} desenvolveram-se métodos de isolamento da enzima pelo uso de cromatografia de troca iônica e mais recentemente HOCKING & HARRIS⁸⁷ prepararam a enzima

de *Thermus aquaticus* por cromatografia de afinidade em NAD^+ imobilizado. Este método permite isolar a enzima em forma homogênea a partir de extrato bruto bacteriano, baseado na forte afinidade da enzima por NAD^+ imobilizado.

Um método rápido e conveniente para isolar a GPDH de eritrócitos humanos foi desenvolvido⁵⁵ baseado no fato de que ela é retida pela membrana celular quando submetida à hemólise hipotônica e que pode ser subsequentemente eluída com altas forças iônicas. SALEEMUDDIN & ZIMMERMANN¹⁶⁰ utilizando método semelhante purificaram as enzimas de músculo, fígado, rim e cérebro de rato que foram eluídas da membrana com NADH 2mM. O fato de que esta classe de enzimas apresenta um alto grau de homologia⁸⁶ sugere que este procedimento pode ser usado para purificar enzimas de outras fontes. No caso da GPDH de levedura a afinidade pela membrana do eritrócito humano parece ser muito fraca, para ser utilizada para purificação¹²⁵.

1.2. ESTABILIDADE

As GPDHs de várias origens são relativamente instáveis em solução, tendendo a se desnaturar espontaneamente à temperatura ambiente e flocular, porém podem ser conservadas por longos períodos de tempo a baixas temperaturas como suspensão de cristais em solução de sulfato de amônio. A es-

tabilidade da enzima é afetada por vários fatores tais como: estabilidade dos grupos sulfidrílicos, presença ou ausência de metais pesados, presença ou ausência de coenzima ligado e o tipo e concentração de sais¹⁹³.

1.3. ESTRUTURA DA ENZIMA

1.3.1. ESTRUTURA PRIMÁRIA

HARRIS & PERHAM, através de métodos químicos envolvendo marcação específica de resíduos de cisteína cataliticamente ativos^{82,147} e caracterização de fragmentos de peptídeos produzidos por clivagem enzimática⁸³, concluíram que a GPDH é composta de subunidades, compreendendo aproximadamente 330 resíduos de aminoácidos, correspondendo a um peso molecular de 36.000.

HARRINGTON & KARR⁸¹ demonstraram por ultracentrifugação que as GPDHs de músculo de coelho e de porco têm peso molecular de 145.000 e que se dissociam em 4 subunidades de peso molecular 36.300 quando tratadas por cloridrato de guanidina 5M.

Análise da seqüência de aminoácidos da enzima de músculo de lagosta⁴⁵, de músculo de porco⁸⁵ e de levedura⁹³ confirmam que as subunidades têm estrutura primária idênti-

ca. Nas três espécies estudadas, 60% dos resíduos ocorrem em seqüência idêntica, demonstrando que a seqüência de aminoácidos da GPDH é conservada em uma maior extensão do que a seqüência de outras enzimas comparáveis, como é o caso da desidrogenase alcoólica⁹⁴. A análise da seqüência de aminoácidos da desidrogenase alcoólica de mamífero e de levedura sugere que filogeneticamente ambas são relacionadas distantemente²¹.

Os resultados da análise de aminoácidos indicam uma seqüência única para cada uma das GPDHs examinadas e não há evidência decisiva para a existência entre estas enzimas de isoenzimas que difiram em seqüência primária, apesar da ocorrência de formas eletroforéticas múltiplas em diferentes organismos, como descrito por LEBHERZ & RUTTER¹¹².

1.3.2. ESTRUTURA DA HOLOENZIMA

Os primeiros dados de difração de raios-X para GPDH foram obtidos por WATSON & BANASZAK²⁰⁰ com cristais da enzima de músculo de lagosta. Estes cristais, que apresentavam cor amarela, que é característico para a holoenzima, eram ortorrômbicos, com o tetrâmero como a unidade assimétrica. Resultados similares foram obtidos para cristais da enzima de músculo humano⁷¹ e de *B. stearothermophilus*¹⁸³. Estudos mais detalhados^{22,23,24} da enzima de músculo de la-

gosta conduziram à primeira interpretação, com alta resolução, da estrutura da GPDH.

Para definir a estrutura da GPDH (Fig. A) tem sido usado um sistema de coordenadas de eixos P, Q e R¹⁵⁹, similar àquele usado previamente para a desidrogenase láctica¹.

O traço mais marcante na estrutura é que embora exibindo aparente simetria 222, o tetrâmero consiste funcionalmente de um dímero de dímero relacionados através do eixo Q. A região de maior interação entre as subunidades é através do eixo P; os contatos relacionados ao eixo Q são relativamente poucos e não são altamente conservados enquanto que os contactos relativos ao eixo R são novamente mais numerosos e altamente conservados²⁴.

Estudos têm demonstrado²⁴ que a estrutura da subunidade consiste de dois domínios. O primeiro domínio compreendendo os resíduos de 1 a 149, é essencialmente o domínio de ligação do coenzima e o segundo, compreendendo os resíduos 150 a 334, provê resíduos para catálise, especificidade e cooperatividade entre as subunidades.

a - O domínio de ligação do NAD⁺

O domínio de ligação do NAD⁺ consiste de uma folha em conformação β formada por 6 cadeias paralelas flanqueadas por hélices (Fig. B).

O NAD⁺ na GPDH está ligado em uma configuração aberta a cada uma das 4 subunidades e está ligado perto da cin-

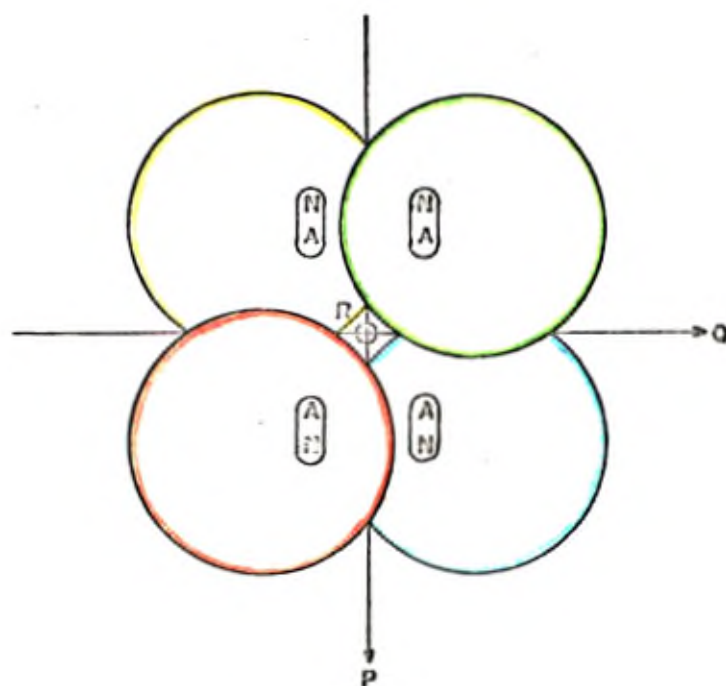


Fig. A: Representação diagramática da associação das subunidades na gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase²⁴.

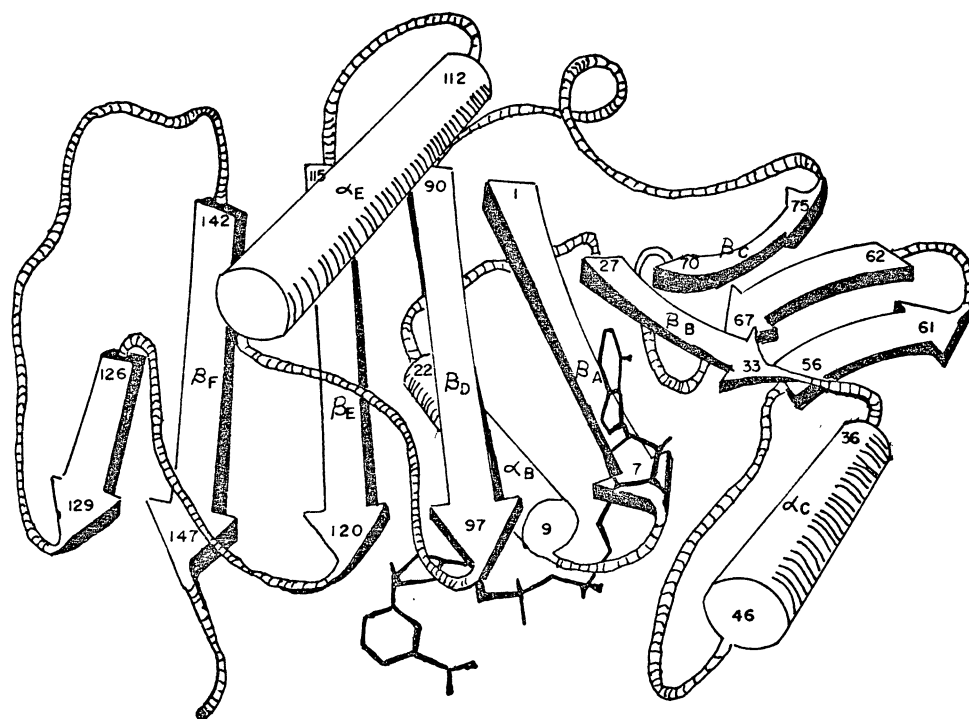


Fig. B: Representação diagramática do domínio de ligação do NAD⁺²⁴.

tura molecular do tetrâmero, perto suficiente para interagir com uma secção de folha antiparalela compreendendo os resíduos 179 a 200.

b - O domínio catalítico

A segunda metade da subunidade consiste primariamente de uma folha formada por 9 cadeias antiparalelas (Fig. C) que forma uma intersubunidade de contacto gerada pelo eixo P. Do outro lado da folha há 3 hélices compreendendo os resíduos 147 a 166, 201 a 216 e 215 a 267 respectivamente. A cadeia polipeptídica termina em uma hélice longa (resíduos 313 a 334) que está associada com o primeiro domínio de modo que o resíduo C-terminal fica próximo do resíduo N-terminal. A cisteína essencial 149 está na junção entre os dois domínios. Este resíduo inicia uma região helicoidal curta na qual a cisteína 153, não reativa, ocorre depois de uma volta, de modo que ela fica próxima da cisteína-149. A cadeia polipeptídica então volta para a vizinhança do centro ativo como parte de uma folha antiparalela que contém histidina-176. Lá segue como uma folha antiparalela, em forma de S (resíduos 179 - 200) que interage com o NAD^+ na subunidade relacionada com o eixo R.

Dos resíduos (aproximadamente 330) de aminoácidos que compõem a subunidade enzimática, 36% estão na conformação de hélice e 40% em folha pregueada (conformação β)²⁴ o que está de acordo com a previsão feita pelas medidas de dis-

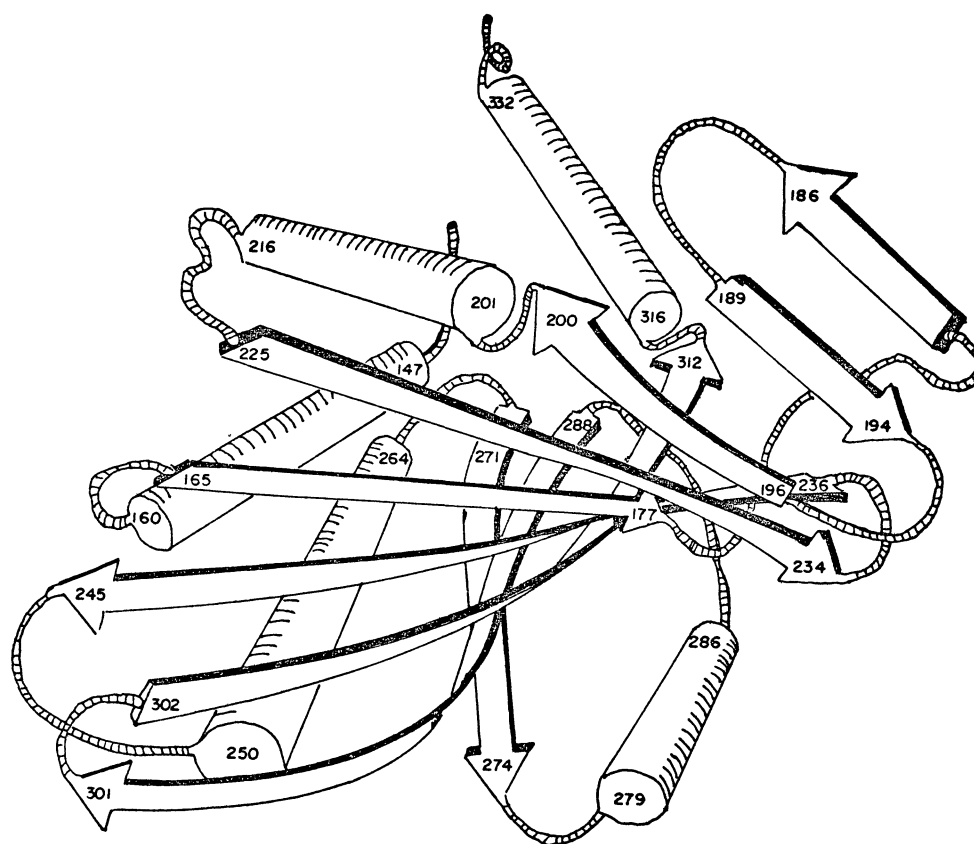


Fig. C: Representação diagramática do domínio catalítico²⁴.

persão ótica rotatória¹²¹ e absorção no infravermelho⁴⁴.

1.3.3. ESTRUTURA DA APOENZIMA

Estudos relativos à estrutura tridimensional da apoenzima de músculo não tem sido possível devido à dificuldade na obtenção de apoenzima estável, em forma cristalina⁶⁵. Cristais estáveis de holo e apoGPDH de *Bacillus stearothermophilus* foram preparados por SUZUKI & HARRIS¹⁸³, apropriados à análise de difração de raios-X. Tem sido demonstrado¹⁸³ que os cristais da holoenzima de *B.stearothermophilus* são ortorrômbicos com grupo espaçador $P2_1 2_1 2$; a célula unitária, como na enzima de lagosta, consiste de 4 tetrâmeros. Estudando-se a estrutura da apoenzima foi demonstrado que os cristais são monoclônicos, e a célula unitária consiste de dois tetrâmeros.

1.4. AMINOÁCIDOS IMPORTANTES DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DE-SIDROGENASE, ESTUDOS DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA

1.4.1. CISTEÍNA

O conteúdo de cisteína da GPDH é variável ficando en-

tre 5 grupos-SH por subunidade para a enzima de músculo de lagosta⁴⁵ e um grupo-SH por subunidade para a enzima de *T. aquaticus*⁸⁷.

A cisteína essencial (Cys-149) é também a mais reativa e é a reação deste resíduo da GPDH que é responsável pela inibição de glicólise e da fermentação por ácido iodoacético^{82,152}. A cisteína-149 também reage seletivamente com outros reagentes, tais como: p-fluorodinitrobenzeno¹⁶⁶, tetrationato^{4,145,148}, iodobenzoato¹⁴⁵ e vários mercuriais orgânicos^{79,199}.

SHALTIEL¹⁶⁵ demonstrou que a dinitrofenilação da GPDH de músculo de coelho à pH 8,0, inativa completamente a enzima. Foi estabelecido por SHALTIEL & TAUBER-FINKELSTEIN¹⁶⁷, após isolamento do peptídeo marcado, que o grupo dinitrofenilado estava fixado na cisteína-149, por analogia com a GPDH de músculo de porco⁸⁵.

Em 1981, FOUCAULT et al.⁶¹ estudando a dinitrofenilação de resíduos de cisteína das GPDHs de músculo de coelho e de levedura, observaram uma perda de atividade correspondendo a uma reatividade de *metade dos sítios* e a uma reatividade de *todos os sítios*, respectivamente. Os resultados sugerem uma estrutura assimétrica para a holo e apoenzima de músculo de coelho, entretanto pelos experimentos não se pode dizer se a assimetria da enzima modificada é induzida ou se ela preexiste na enzima nativa. Estes resultados estão em concordância com estudos de modificação química e

de ressonância nuclear magnética que indicam uma estrutura assimétrica para a holoenzima de músculo de coelho^{13,17} e com os resultados cristalográficos sugerindo uma estrutura assimétrica para a holo e apoGPDH de lagosta^{14,72,129,132}.

Para a apo e holoenzima de levedura os resultados de dinitrofenilação sugerem uma estrutura simétrica⁶¹. Embora estes resultados possam ser interpretados de acordo com o modelo de MONOD¹²⁸, a estrutura simétrica da apo e holoGPDH de levedura é também coerente com o modelo do *ajuste induzido* proposto por KOSHLAND et al.¹⁰¹.

Na estrutura nativa da GPDH, a cisteína-153 não é reativa, embora sob certas condições seja capaz de formar uma ligação dissulfeto intracadeia com a cisteína-149^{145,199}.

1.4.2. LISINA

Foi demonstrado^{124,149} que um resíduo de lisina na GPDH, identificado como lisina-183 na sequência primária⁸⁵ pode ser acetilado irreversivelmente quando a apoenzima reage com p-nitrofenilacetato ou acetilfosfato, em pH alcalino. A N-acetilação ocorre não pela reação direta com a lisina-183, mas como resultado de uma migração do grupo acetila do S da cisteína-149 para o N da lisina-183. Isto implica que a lisina-183 está perto da cisteína-149 na estrutura quaternária da apoenzima, o que foi confirmado por

SHALTIEL & TAUBER-FINKELSTEIN¹⁶⁸ pelo uso de um reativo bifuncional, o 1,5 difluoro-2-4-dinitrobenzeno, que forma uma ponte entre o grupo sulfidrílico da cisteína-149 e o grupo ϵ -aminado da lisina-183. Segundo REISLER et al.¹⁵⁴ estes dois grupos funcionais podem se aproximar um do outro a uma distância de 6 Å. Esta distância crítica de 6 Å confirma as observações de HARRIS & POLGÁR⁸⁴ para explicar a transferência do grupo acetila da cisteína-149 sobre o grupo ϵ -aminado da lisina-183.

Dois papéis foram sugeridos para a lisina-183: ser o sítio de ligação para o fosfato do gliceraldeído-3-fosfato¹⁴⁹ ou o sítio de fixação do coenzima^{24,124}. Entretanto, segundo FOUCAULT et al.⁶⁰, o resíduo de lisina-183 não estaria implicado no sítio catalítico nem no sítio de ligação do coenzima. Segundo os autores este resíduo parece desempenhar papel na área de contacto entre duas subunidades adjacentes (vermelho-verde e azul-amarelo) da qual flui informação conformacional para a ligação do NAD^+ ou arseniato à proteína. Este resultado está em acordo com estudos cristalográficos^{15,129} nos quais foi observado que a lisina-183 está localizada na área de contacto entre duas subunidades adjacentes. Este resíduo, comum às enzimas de levedura, de porco e de lagosta^{84,85} é substituído por uma arginina na GPDH de *B.stearothermophilus*¹⁵.

1.4.3. ARGININA

A modificação química de 8 resíduos de arginina do tetrâmero da enzima de levedura por butanodional¹³³ ocasiona a perda da atividade de desidrogenase. Embora a enzima modificada possa ainda fixar o NAD^+ , a reatividade dos grupos-SH do sítio ativo decresce, sugerindo que esta parte do sítio ativo foi alterada.

MORAS et al.¹²⁹ estudando a estrutura tridimensional da enzima de lagosta, evidenciam um papel eventual da arginina-231 na fixação do substrato.

1.4.4. TIROSINA

MORAS et al.¹²⁹ demonstraram por cristalografia que o núcleo da nicotinamida da GPDH é paralelo ao resíduo de tirosina-317, sendo a distância entre os dois núcleos de 4 Å. Esta proximidade poderia ser importante para a formação da Banda de Racker¹⁵⁰.

1.4.5. HISTIDINA

Embora a histidina tenha sido implicada no mecanismo catalítico da GPDH, não há nenhuma evidência química para o

envolvimento direto de um resíduo de histidina no sítio ativo^{80,141}.

Estudos de fotooxidação^{19,63} demonstraram que a inativação da enzima de músculo de coelho estava associada com a destruição específica da His-138. Entretanto, no caso da GPDH de lagosta este resíduo é substituído por ácido glutâmico, o que torna improvável seu envolvimento no sítio ativo.

Estudos cristalográficos¹²⁹ porém, evidenciam que um resíduo de histidina-176 está presente no sítio ativo, na vizinhança da cisteína-149.

1.5. ESTUDOS SOBRE INTERAÇÃO DO NAD^+ COM A GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE

1.5.1. MECANISMO DE FIXAÇÃO DO NAD^+

Um dos problemas mais freqüentemente abordados no estudo da GPDH está relacionado com a afinidade do coenzima pela enzima e o papel estrutural e catalítico das diferentes moléculas de NAD^+ fixadas. Quatro moléculas de coenzima podem se ligar à enzima tetramétrica, mas a afinidade de ligação em geral decresce para a enzima de músculo, com o grau de saturação de NAD^+ , exibindo portanto o fenômeno de

cooperatividade negativa^{16,36,50}. Ao contrário para a enzima de levedura, a cooperatividade é essencialmente positiva^{37,96,97,98}. Foi demonstrado que o NADH não se liga tão firmemente quanto o NAD⁺, porém a afinidade de ligação é igual em todas as subunidades¹⁹⁶.

Uma variedade de diferentes modelos tem sido sugerido para explicar o papel efetor do NAD⁺. KIRCHNER e cols.^{96,97,98,196} demonstraram que a ligação do NAD⁺ à enzima de levedura pode ser descrita pelo modelo de MONOD et al.¹²⁸, o qual requer a existência de conformações diferentes, altamente simétricas. KOSHLAND e cols.^{36,37,101} propõem um modelo seqüencial para a ligação do NAD⁺ à enzima de músculo, em que ocorre uma mudança de conformação induzida pelo ligante (ajuste induzido).

1.5.2. BANDA DE RACKER

Quando o NAD⁺ liga-se à enzima, uma cor amarela característica se desenvolve, devido a uma larga banda de absorção com um máximo a 360 nm, conhecida como *banda de Racker*^{108,150}. A química da ligação do NAD⁺ à GPDH está ainda no estágio especulativo. Numerosas proposições tem sido feitas, como por exemplo: ligações covalentes, ligações eletrostáticas e complexos de transferência de carga. Os grupos sulfidrílicos da GPDH foram implicados como prováveis

sítios de ligação do NAD^+ desde que foi demonstrado que a banda de Racker era abolida por iodoacetato, p-cloromercu-ribenzoato, acetilfosfato¹⁵⁰ ou H_2O_2 ¹³⁸. Foi sugerido¹⁵¹ que a ligação do NAD^+ com a enzima era do tipo covalente entre o S da cisteína e o C_4 do anel da nicotinamida; evidências porém, parecem não comprovar esta hipótese. Uma explicação alternativa para o espectro do complexo NAD^+ -enzima foi primeiro sugerida por KOSOWER^{102,103,104} que propõe a existência de um complexo de transferência de carga entre o NAD^+ e a enzima. Por outro lado, o estudo de compostos modelos mostram que pode haver um complexo de transferência de carga entre o anel indol de um resíduo de triptofano e o anel nicotinamida^{32,33,171}. A existência da banda de Racker poderia ser interpretada, portanto, como o reflexo da existência de um complexo de transferência de carga entre um resíduo de triptofano da enzima e a nicotinamida do NAD^+ . Baseadas nestes dados, duas explicações podem ser propostas; a primeira supõe a existência de um efeito estérico, resultante da substituição da cisteína do sítio ativo que pode induzir uma mudança na conformação da enzima tornando impossível a interação indol-nicotinamida. A segunda explicação supõe a existência de um efeito estérico, resultante da substituição da cisteína, que suprime a banda de Racker; neste caso a cisteína estaria próxima de um resíduo triptofano.

Estudos cristalográficos mais recentes da holoenzima

de lagosta^{24,129} sugerem que a banda de Racker seria o produto de um complexo de transferência de carga entre a cisteína e a nicotinamida do coenzima. Foi demonstrado que o enxofre da cisteína está a uma distância de 2 Å e 4 Å da nicotinamida na subunidade *vermelha* e *verde*, respectivamente. Por outro lado estes dados cristalográficos mostram que a nicotinamida do NAD⁺ está paralela à tirosina-317 e a uma distância de 4 Å, portanto devido a esta proximidade a tirosina-317 não pode ser excluída como fator contribuinte para a formação da banda de Racker.

1.6. REATIVIDADE DE METADE DOS SÍTIOS

As GPDHs de várias origens exibem um fenômeno denominado *reatividade de metade dos sítios* que consiste na *limitação estequiométrica de uma reação irreversível por uma metade dos sítios ativos potenciais da molécula*.

Foi observado uma perda total da atividade enzimática quando duas das quatro subunidades da GPDH são modificadas por agentes arilantes ou alquilantes tais como: p-fluorodinitrobenzeno, ácido iodoacetamida salicílico, 4-iodoacetamidanaftol, p-fluoro.m.m'-dinitrofenil sulfona^{76,113,114,120,122,123,164}. Entretanto com outros reagentes alquilantes como iodoacetato, iodoacetamida, N-etilmaleimida, as quatro subunidades devem estar modificadas para que ocorra inati-

vação irreversível da atividade de desidrogenase¹¹⁴.

De acordo com MACQUARRIE & BERNHARD¹²⁰ e SEYDOUX et al.¹⁶⁴ a reatividade de *metade dos sítios* está relacionada com uma assimetria preexistente na proteína, entretanto LEVITZKI^{113,114} e STALLCUP & KOSHLAND^{177,178,179} sugerem que a reatividade de *metade dos sítios* é induzida por ligantes e que a apoenzima tem uma estrutura simétrica.

FOUCAULT et al.⁶¹ observaram que a dinitrofenilação da apoenzima de levedura, que procede de acordo com o mecanismo de *metade dos sítios* é acompanhada por uma mudança conformacional, que pode ter sido induzida pela ligação covalente do reagente químico em uma estrutura simétrica. Esta simetria foi também sugerida por trinitrofenilação dos quatro resíduos equivalentes da lisina-183 por tetrâmero e pela subsequente perda da atividade¹³⁵. Para a holoenzima de levedura, a perda da atividade segue um mecanismo de *todos os sítios* e favorece uma estrutura simétrica⁶¹.

Em relação à apoenzima de músculo de coelho, estudos de dinitrofenilação têm sugerido que a enzima modificada comporta-se como uma estrutura assimétrica, entretanto torna-se impossível deduzir se a assimetria da enzima modificada é induzida ou se ela preexiste na apoenzima nativa⁶¹.

1.7. MODIFICAÇÕES DA GPDH RELACIONADAS COM O ENVELHECIMENTO

A presença de modificações nas propriedades enzimá-

ticas dependentes da idade do organismo, tem sido demonstrada e investigada em numerosos estudos. A modificação mais comum nas enzimas *velhas* é a perda parcial da atividade catalítica, em torno de 40 a 60%, na maioria dos casos. Outras diferenças observadas entre as enzimas *jovens* e *velhas* relacionam-se à inativação^{155,157}, reatividade dos grupos sulfidrílicos⁶⁹, valores de K_m ^{156,169} e algumas propriedades óticas espectroscópicas¹⁷⁰. Estas diferenças entre as moléculas enzimáticas *jovens* e *velhas*, embora significativas, não são muito pronunciadas e em alguns casos são bastante pequenas⁶⁹.

Recentemente, GAFNI^{66,67,68,69} demonstrou modificações relacionadas com a idade do organismo em várias propriedades da GPDH de músculo de rato. A modificação mais marcante foi a redução da afinidade da enzima *velha* em relação ao NAD^+ e seu análogo fluorescente, nicotinamida 1,N⁶-etenoadenina dinucleotídeo⁶⁹. Foi concluído à partir destes resultados que com o envelhecimento do organismo, ocorrem modificações nas subunidades, entretanto a interação entre as subunidades não é afetada significativamente. Portanto, modificações da GPDH, relacionadas com a idade ocorrem nos sítios de ligação da nicotinamida, mas não nos sítios de ligação da adenina⁶⁷.

Embora o conhecimento mais aprofundado das modificações estruturais envolvidas no processo de envelhecimento seja de fundamental importância, isto ainda não havia sido

alcançado em quaisquer dos sistemas anteriormente estudados. Entretanto como descrito acima, GAFNI^{67,69} estudando as modificações relacionadas com a idade em GPDH, conseguiu evidências para a localização destas modificações estruturais na enzima isolada de músculo de rato.

1.8. MECANISMO DE AÇÃO DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE

A GPDH catalisa a oxidação fosforilativa reversível de gliceraldeído-3-fosfato, em uma reação que acopla a oxidação de um aldeído, para a síntese de um anidrido fosfato de alta energia, o 1,3 difosfoglicerato¹¹⁷. O uso de arseniato em vez de fosfato resulta na formação de 1-arseno-3-fosfoglicerato que é rapidamente e não enzimaticamente hidrolisado a 3-fosfoglicerato, tornando a reação irreversível. Outros aldeídos podem também ser oxidados originando os acilfosfatos correspondentes¹³⁷.

A GPDH apresenta numerosas outras atividades que, embora não fisiológicas, têm ajudado a elucidar o mecanismo da reação fisiológica normal. A natureza destas outras atividades, tais como transferência de grupos acila e atividade esterásica, tem sido bem estudada³⁴ e podem ser explicada em termos de formação intermediária de acil-enzima.

Vários mecanismos têm sido propostos para a reação catalisada pela GPDH. Segundo ORSI & CLELAND¹⁴² o mecanismo cinético para a GPDH de músculo de coelho é do tipo *ordenado*, com o NAD^+ , aldeído e fosfato ou arseniato acrescentando-se em ordem e a liberação do ácido precedendo à liberação do NADH.

Por outro lado, SEGAL & BOYER¹⁶³ portulam para a GPDH um mecanismo do tipo *ping-pong*. Estudos cinéticos realizados por TRENTHAM e cols.^{79,80,187,188,189} com a enzima de porco e por DUGGLEBY & DENNIS⁵⁴ com a enzima de *Pisum sativum* dão apoio a este mecanismo.

Estudos recentes, realizados por WANG & ALAUPOVIC¹⁹⁷ com a GPDH de eritrócitos humanos, indicam que a reação catalisada por esta enzima segue um mecanismo ordenado *ter bi*, caracterizado pela adição seqüencial de NAD^+ , G3P e fosfato à enzima e a liberação seqüencial de 1,3-difosfoglicerato e NADH da enzima. Este mecanismo proposto está de acordo com o mecanismo cinético proposto por ORSI & CLELAND¹⁴² para a reação catalisada pela GPDH de músculo.

Em 1968, HARADA & WOLFE, para explicar seus dados com a enzima malato desidrogenase^{77,78}, introduziram o conceito que múltiplos sítios em uma enzima poderiam atuar de modo alternado ou independente, durante a catálise. Este modelo sugere diferentes conformações para as duas subunidades, tal que uma liga os produtos e outra liga os substratos, mais prontamente. A mudança na ligação do substrato de uma sub-

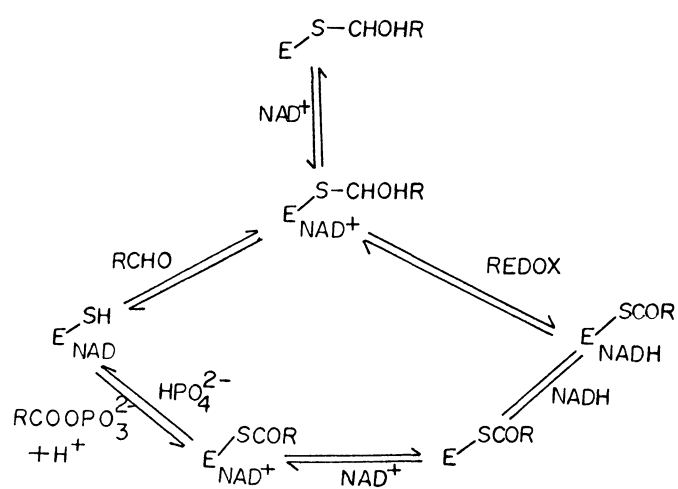


Fig. D: Mecanismo de reação da GPDH proposto por SEGAL & BOYER¹⁶³ e adaptado por HARRIS & WATERS⁸⁶.

unidade promove liberação do produto em outra subunidade.

KELLERSHOHN & SEYDOUX⁹⁵, trabalhando com GPDH de esturção, fornecem evidências que nesta enzima os sítios possam participar de uma maneira alternada.

Através dos estudos de TRENTAM¹⁸⁹ e PECZON & SPIVEY¹⁴⁶ foi demonstrado a equivalência dos sítios em um ciclo catalítico, entretanto um modelo de sítio alternado ou um modelo de sítio independente são compatíveis com estes dados.

Recentemente, CARDON & BOYER²⁶ estudando a influência da interação entre subunidades na reação catalisada pela GPDH de músculo de coelho, propõem um modelo simples com alternância de sítios, como demonstrado na figura E. Neste caso são considerados dois sítios catalíticos interconvertíveis, o tetrâmero podendo participar com dois dímeros equivalentes ou como um todo com dois sítios essencialmente equivalentes.

1.9. PAPEL METABÓLICO DA GPDH

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é uma enzima comum às vias glicolítica e gluconeogênica. As enzimas de músculo e de fígado são similares em estrutura e propriedades^{111,175} e portanto o comportamento diferente da enzima no músculo e no fígado deve ser atribuído a diferenças no

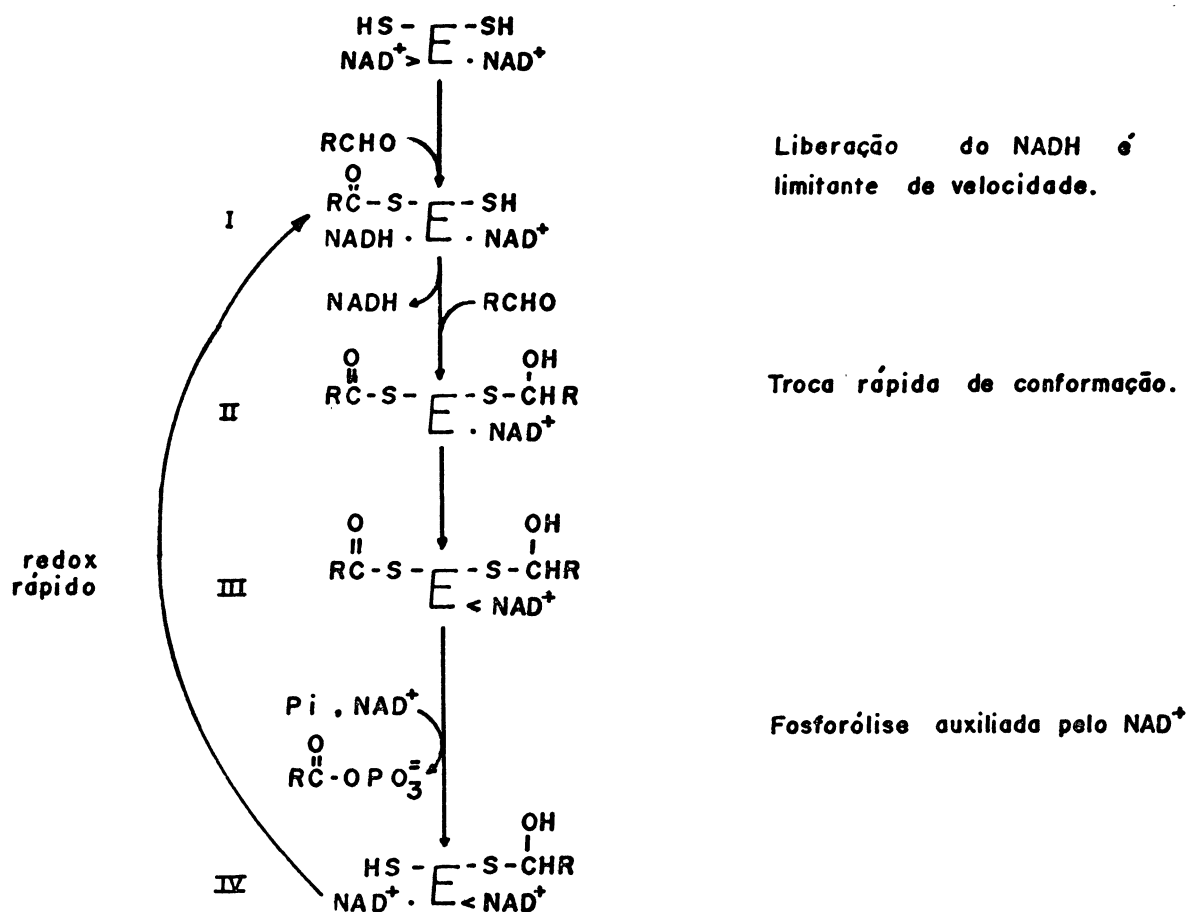


Fig. E: Um esquema de catálise pela GPDH com cooperatividade catalítica entre subunidades, proposto por CARDON & BOYER²⁶.

ambiente celular. No fígado, sob condições normais, a GPDH catalisa uma reação em equilíbrio e não apresenta uma função reguladora dependente de efetores⁸⁶. Entretanto, em cérebro e coração de rato foi demonstrado que a GPDH está deslocada de seu valor de equilíbrio^{119,202}. Em coração de rato, a principal enzima que controla a velocidade da via glicolítica é a fosfofrutoquinase, entretanto a piruvato quinase e a GPDH são sítios inibitórios particularmente sensíveis, desde que as reações catalisadas por estas enzimas não são mantidas em equilíbrio e indiretamente controlam os níveis de frutose-1,6-difosfato e 1,3-difosfoglicerato²⁰².

Pesquisando a possibilidade da GPDH ser realmente uma enzima regulatória ou *limitante* de velocidade, não deve ser esquecido que a atividade efetiva de uma enzima na célula é controlada por vários fatores; podemos citar como exemplo o fato de que a GPDH em pH fisiológico opera com somente 20% de sua atividade máxima³⁹.

A GPDH é também inibida por vários nucleotídeos de adenina^{62,139,140,203} embora, *in vivo*, o ATP seja o único nucleotídeo normalmente presente em concentrações suficientemente elevadas para causar uma inativação significativa. Em concentrações fisiológicas normais de ATP, a GPDH deveria estar inibida 67% a pH 7,4 e 87%, a pH 6,8¹³⁹.

Nos eritrócitos a GPDH opera com menos de 1% de sua capacidade máxima¹²⁷ devido à inibição por NADH e um alto Km para o fosfato.

Estas considerações feitas em relação aos muitos fatores que afetam a atividade da GPDH ilustram que a enzima pode muito bem desempenhar um papel regulatório importante na glicólise apesar de sua aparente alta atividade *in vitro*.

1.10. RELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA PROTÊICA E EVOLUÇÃO: CONTRIBUIÇÃO DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE

A investigação da estrutura das proteínas pode fornecer informação acerca da estabilidade destas macromoléculas e as relações evolucionárias entre elas. Historicamente o estudo da evolução biológica tem sido focalizado em relação à taxonomia dos organismos e de fósseis de espécies extintas. Estes estudos geram um modelo detalhado de desenvolvimento evolucionário de organismos multicelulares. Nos últimos 20 anos entretanto, a caracterização biológica das relações evolucionárias tem sido estendida para o nível molecular. Comparação das similaridades na sequência de nucleotídeos nas moléculas de DNA e nas sequências de aminoácidos nas proteínas tem tornado possível o estudo da evolução a nível de genes e seus produtos finais. Recentemente, a caracterização das relações evolucionárias a nível molecular envolve também exame das estruturas tridimensionais

dobradas das seqüências protéicas, como determinado por análise estrutural do cristal por difração de raios-X. A comparação entre estruturas muito similares ou muito diferentes pode ser usada para indicar relações taxonômicas entre proteínas¹⁸⁶.

Existem proteínas cuja estrutura é conservada por um longo período evolucionário, como é o caso do citocromo c^{52,161}. O citocromo c devido a seu pequeno tamanho (103-112 aminoácidos), acoplado à relativa facilidade de purificação e sua estabilidade, tornou-se uma proteína bastante estudada em relação à seqüência de aminoácidos em uma grande variedade de organismos. A homologia entre as várias seqüências estudadas (mais de 50) é evidente, havendo cerca de 64 aminoácidos em idêntica posição no citocromo c isolado do homem e de levedura⁵⁹. A chance de que estas seqüências similares fossem provenientes de evolução convergente é muito remota e é mais provável que esta similaridade seja devida à evolução de um gene ancestral comum. Os aminoácidos que não mudam, são provavelmente aqueles que não podem ser alterados sem que a função da proteína seja prejudicada.

O citocromo c tem evoluído a uma velocidade comparativamente lenta e portanto organismos relacionados proximalmente têm a mesma seqüência, como por exemplo: homem e chimpanzé; zebra e jumento; couve-flor e nabo⁵⁹.

Estudando-se a seqüência de aminoácidos de uma de-

terminada proteína em uma grande variedade de organismos, é possível apresentar o resultado em forma de uma árvore filogenética. Na maioria dos casos esta informação está em concordância com o que se espera de uma classificação convencional e filogenética; é notável que isto possa ser feito baseado em uma só proteína. Entretanto, no caso do citocromo c, há alguns pontos de desacordo, por exemplo: a galinha está mais próxima do pingüim (2% de diferença na sequência) do que da pomba ou pato (3 - 4%). Similarmente, a tartaruga está mais próxima dos pássaros (8%) do que de outro réptil, a cobra cascavel (21%). A determinação de que estas e outras discrepâncias são devidas à convergência ou a erros na filogenia atual, requerirá evidência de muito mais dados e estudo de outras proteínas⁵⁹.

LYDDIATT et al.¹¹⁵ estudando as seqüências do citocromo c de certos anelídeos, moluscos e equinodermas descobriram que a filogenia derivada destes organismos não está em concordância com a visão correntemente aceita para a evolução dos invertebrados.

Além do citocromo c, as proteínas mais estudadas em relação à seqüência de aminoácidos são as globinas dos vertebrados (α e β polipeptídeos) e a mioglobina. As globinas evoluem cerca de 4 vezes mais depressa do que o citocromo c, o que torna o seu estudo apropriado para a solução de problemas filogenéticos de nível mais baixo na escala filogenética.

GOODMAN, M.*, citado por FERGUSON, A.⁵⁹, demonstra a filogenia dos genes da globina. A árvore da globina está em muitos aspectos em boa concordância com uma filogenia baseada em evidências morfológicas e outras.

Para estudos abaixo do nível de família, proteínas que evoluem mais depressa são disponíveis como por exemplo os fibrinopeptídeos que demonstram uma taxa de substituição de aminoácidos 20 vezes maior do que o citocromo c. MROSS & DOOLITTLE¹³⁰ através de estudos de seqüência de aminoácidos de fibrinopeptídeos estabeleceram uma árvore filogenética para a ordem Artiodactyla dos mamíferos. Novamente houve uma boa concordância com os métodos convencionais.

A análise da seqüência de aminoácidos é de grande proveito para estudos filogenéticos, entretanto é importante que se teste sua utilidade em estudos sistemáticos de alta categoria, em grupos de organismos, como os vertebrados, que têm um registro fóssil relativamente bom, antes que esta técnica seja estendida a invertebrados e plantas para os quais os registros fósseis são poucos ou ausentes. A determinação da seqüência de aminoácidos é um procedimento lento e dispendioso e requer também relativamente grandes quantidades da proteína putificada. Tem se observado que muitas das seqüências examinadas são daqueles organismos prontamente disponíveis aos bioquímicos, isto é, animais de labo-

*GOODMAN, M. 1976. *Protein sequences in phylogeny*. In: Ayala, F.J.ed. Molecular Evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

ratório e aqueles facilmente obtidos no comércio. Para uma informação sistemática significativa, entretanto, o estudo de muitas outras seqüências será necessário.

Do exposto acima, podemos concluir que as relações filogenéticas entre os seres vivos, interpretadas à luz de métodos convencionais de análise filogenética, tais como análise morfológica de espécies vivas e fósseis, podem estar sujeitas a erros. Como alternativa de estudo destas relações filogenéticas, a análise estrutural de proteínas de evolução lenta ou de evolução rápida fornece valiosos subsídios para novas interpretações e estabelecimento de novas linhas filogenéticas.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, semelhante ao citocromo c, pode ser considerada uma proteína de evolução lenta, já que apresenta 68% de homologia na seqüência de aminoácidos entre seres tão distantes filogeneticamente como mamíferos e levedura^{85,93}, tornando-se um excelente instrumento para este tipo de análise, uma vez que é relativamente fácil a sua obtenção em forma pura e com grande rendimento. Embora a GPDH tenha sido purificada de uma grande variedade de fontes, para um possível estudo filogenético uma gama muito maior de organismos deve ser estudada. Visando este objetivo, propomos o estudo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de *Caiman* sp, uma vez que pouco se sabe a respeito desta enzima em répteis. O estudo constará do isolamento, purificação e pro-

priedades da GPDH de músculo de *Caiman sp*, comparativamente às enzimas isoladas de outras fontes.

Embora nesta tese não se proponha realizar estudos estruturais mais aprofundados tais como determinação da sequência de aminoácidos e estudos de difração de raios-X, entendemos que com a purificação e caracterização da GPDH de réptil estaremos dando importantes subsídios para um estudo posterior de estrutura. Futuramente quando os dados de análise estrutural forem suficientes para cobrir uma gama relativamente grande da escala filogenética, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase poderá contribuir significativamente para a obtenção de informações sistemáticas de grande importância.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REATIVOS QUÍMICOS

NAD, NADH, G3P, Nbs₂ e Hemoglobina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. DEAE-Sephadex A-50 foi obtido da Pharmacia Fine Chemicals. Os outros reagentes eram produtos prontos para análise e todas as soluções foram preparadas com água destilada e desionizada.

2.2. PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO

Para a obtenção do substrato livre, DL-gliceraldeído-3-fosfato, na forma de sal de bário, foi tratado com Dowex 50 X4 (Sigma), na proporção de 1,5 mg de Dowex para 100 mg de substrato. A solução resultante foi aquecida a 100°C por 3 minutos, com agitação, para a obtenção do aldeído livre. Na hora do uso o pH da solução que era de aproximadamente 2,0 era ajustado para 7,0, com uma solução de KOH 15%.

2.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO

A concentração de gliceraldeído-3-fosfato foi determinada espectrofotometricamente em presença de excesso de NAD, Na_2HAsO_4 e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, de acordo com o método de FURFINE & VELICK⁶⁵. A mistura de incubação continha tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, arseniato de sódio 50mM, NAD 1mM, enzima em excesso (aproximadamente 20 μ g) e 3 a 5 μ l da solução de gliceraldeído-3-fosfato a ser testada. O volume total foi de 1,0 ml; o branco continha todos os componentes acima exceto que G3P foi substituído por igual volume de água. Depois que o espectrofotômetro foi zerado, a reação foi iniciada pela adição de G3P na segunda cubeta. O progresso da reação foi seguido a 340 nm e depois da reação ser completada calculou-se o aumento da D.O. entre as absorbâncias inicial e final. A concentração de G3P foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{G3PmM} = \frac{\text{D.O.}_{340 \text{ nm}} \cdot \text{volume total do ensaio}}{6,22 \cdot \text{volume da amostra}}$$

2.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NAD E NADH

A concentração de NAD foi determinada espectrofotometricamente lendo-se diretamente a absorbância a 260nm. Para cada determinação foram usadas pelo menos duas alíquotas com diferentes concentrações do componente a ser testado. A concentração de NAD foi calculada usando-se um coeficiente de extinção molar de $17.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ¹⁷³ de acordo com a seguinte equação:

$$\text{NAD mM} = \frac{\text{D.O.}_{260 \text{ nm}} : 17,6 \cdot \text{volume total}}{\text{volume da amostra}}$$

A concentração de NADH foi determinada espectrofotometricamente pela medida da absorbância a 340 nm, do mesmo modo que para o NAD, usando-se um coeficiente de extinção molar de $6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ⁸⁹.

2.5. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA GPDH

A GPDH de músculo de *Caiman sp* foi isolada e purificada essencialmente como descrito por CORI et al.³⁹. Todas as etapas do processo de isolamento e purificação foram rea-

lizadas a 4°C e as centrifugações foram feitas a 12.000 x g por 30 minutos.

2.5.1. EXTRAÇÃO

O réptil foi decapitado e os músculos rapidamente retirados. Os pedaços de músculo foram moídos com um moedor de carne elétrico e a atividade enzimática foi extraída por tratamento com dois volumes de KOH 0,03N, durante 15 minutos, com agitação ocasional. O material foi filtrado através de gaze; o pH da solução foi ajustado para 6,8 com NH_4OH e posteriormente centrifugado.

2.5.2. FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO

A solução sobrenadante obtida anteriormente foi resfriada em banho de gelo e sulfato de amônio sólido foi acrescentado lentamente, com agitação constante, até que uma saturação de 52% foi alcançada. Após 60 minutos, o precipitado foi removido por centrifugação e desprezado. A solução sobrenadante foi tratada com sulfato de amônio até alcançar uma saturação de 72%. Após 60 minutos, o material foi centrifugado e ao sobrenadante (pH 6,5) foi acrescentado NH_4OH , gota a gota, até pH 8,3. Depois de aproximadamente 65 ho-

ras, a solução foi centrifugada e o precipitado obtido foi suspenso em EDTA 5mM pH 7,6, de modo que a concentração de proteína ficasse em torno de 20 mg/ml. A este material foi acrescentado dois volumes de uma solução saturada de sulfato de amônio pH 8,4 contendo mercaptoetanol na concentração 1 mM e deixado em repouso a 4°C na tentativa de cristalização da enzima.

2.5.3. CROMATOGRAFIA EM DEAE-SEPHADEX A-50

Não se conseguindo a cristalização da enzima com o procedimento acima, procurou-se obter uma maior purificação da mesma através de cromatografia em DEAE-Sephadex. A solução de enzima foi dialisada *overnight* em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM e aplicada a uma coluna de DEAE-Sephadex A-50 (42cm x 2,5cm) equilibrada em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM. A enzima foi eluída com o mesmo tampão a um fluxo de 28 ml/hora. A GPDH de músculo de *Caiman sp* não é retida nesta coluna e foi eluída imediatamente após o volume morto. As frações ativas foram reunidas e dialisadas por 72 horas contra uma solução saturada de sulfato de amônio pH 8,4, contendo 2-mercaptoetanol 1mM. O precipitado obtido por centrifugação foi suspenso em EDTA 5 mM pH 7,6, acrescentando-se a seguir, lentamente, dois volumes de

uma solução de sulfato de amônio saturada, pH 8,4, contendo 2-mercaptoetanol 1mM na tentativa de cristalização da enzima.

2.6. DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

A proteína foi estimada pelo método de WARBURG & CHRISTIAN¹⁹⁸ e também pelo método de LOWRY¹¹⁸, usando-se soro albumina bovina como padrão.

A concentração da proteína-enzima foi medida espectrofotometricamente, usando-se um coeficiente de extinção de 0,9 a 280 nm, determinado pelo peso seco da solução de proteína, como descrito por FERDINAND, em 1964⁵⁸. Para esta determinação, a GPDH foi dialisada *overnight* em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM. A absorbância a 280 nm para diferentes alíquotas da enzima dialisada foi determinada. Alíquotas da enzima colocadas em cadinhos previamente aferidos, foram secas em estufa a 60°C, até que o peso não apresentasse mais variação. Em cada caso foi feita uma correção usando-se um branco que continha somente tampão.

2.7. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi medida a 25°C, seguindo-

se a redução do NAD nos primeiros 15 segundos, a 340 nm, usando-se um espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635-D, acoplado a um registrador e termostato. O sistema de incubação em um volume final de 1 ml continha tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, arseniato de sódio 50mM, NAD 1mM, gliceraldeído-3-fosfato 1mM e 1 a 2 µg de proteína. A reação foi iniciada pela adição do substrato desde que o gliceraldeído-3-fosfato é instável em soluções aquosas, decompondo-se com o tempo^{41,47}.

2.8. UNIDADE DE ENZIMA

Uma unidade de enzima foi considerada como sendo a quantidade de enzima capaz de reduzir 1 µmol de NAD por minuto, a 25°C. A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por miligrama de proteína.

2.9. ELETROFORESE

2.9.1. ELETROFORESE DE ZONA

Eletroforese de zona em fitas de poliacetato de celulose (Chemetron), da GPDH purificada (100 µg) foi reali-

zada: a- em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,6; b- em tampão acetato de amônio 0,025M, pH 5,8. Em ambos os casos a eletroforese foi corrida a 250 volts, por 5 horas, a 4°C. A proteína foi revelada com *Coomassie Brilliant Blue* (1,25 g do corante + 454 ml de etanol a 50% + 46 ml de ácido acético glacial). O descolorante continha 475 ml de metanol + 475 ml de água + 50 ml de ácido acético⁹¹. As fitas foram conservadas em uma solução de ácido acético a 7%.

2.9.2. ELETROFORESE DE DISCO, EM GEL

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi desenvolvida em aparelho Ortec, modelo 4200, usando-se um sistema para proteínas básicas descrito por KUCHLER¹¹⁰ sendo de 20 µg a concentração de proteína da amostra. Foi também utilizado o sistema descrito por DAVIS⁴⁶, a pH 9,0 com géis na concentração de 8% de poliacrilamida.

Os géis foram polimerizados em cilindros de vidro (0,5cm x 9,5cm), usando-se persulfato de amônio como catalisador¹⁴⁴. As bandas de proteína foram localizadas imergindo o gel por aproximadamente 2 horas, a 25°C, numa solução de *Coomassie Brilliant Blue* 0,1% em ácido acético glacial 7,5% (v/v) e álcool etílico 50% (v/v)¹⁹⁴. A descoloração foi feita com lavagens sucessivas numa solução de etanol: H₂O: ácido acético glacial (25:65:8).

2.9.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS

A eletroforese em géis, na concentração de 10% de poliacrilamida, contendo 0,1% de SDS foi realizada de acordo com o método descrito por WEBER & ORBORN²⁰¹. Foram aplicadas 10 µg da amostra; as bandas de proteína foram localizadas imergindo o gel por aproximadamente 2 horas numa solução contendo 475 ml de metanol a 50% (v/v) + 46 ml de ácido acético glacial + 1,25g de *Coomassie Brilliant Blue*. A descoloração foi feita numa solução de 50 ml de metanol + 75 ml de ácido acético glacial, para 1 litro de água.

2.10. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

2.10.1. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS

O peso molecular da GPDH de músculo de *Caiman sp* foi determinado de acordo com WEBER & ORBORN²⁰¹. O peso molecular da subunidade da enzima foi estimado por comparação de sua mobilidade em gel, em relação à mobilidade da proteína marcadora *Hemoglobin, cross-linked* considerando-se como 16.000, 32.000, 48.000 e 64.000, os pesos moleculares do monômero,

dímero, trímero e tetrâmero, respectivamente, de acordo com o boletim técnico nº MWS da Sigma Chemical Co¹⁷².

2.10.2. FILTRAÇÃO EM GEL-SEPHADEX G-150

O peso molecular aparente da GPDH, foi determinado por filtração em gel-sephadex G-150, em uma coluna de 2,6 cm x 37,5 cm, equilibrada com tampão Tris-HCl, 0,05M, pH 8,0, contendo EDTA 1mM; e 2-mercaptoetanol 1mM. Este mesmo tampão foi usado como eluente. O volume morto da coluna foi determinado com *Blue dextran* 2.000 (P.M. 2×10^6). Os padrões de proteína usados para a calibração da coluna foram: citocromo c (P.M. 12.500), albumina bovina (P.M. 67.000), aldolase (P.M. 158.000) e catalase (P.M. 240.000). Frações de 4,2 ml foram coletadas a um fluxo de 0,3 ml por minuto. As posições de eluição da aldolase¹⁸⁵ e GPDH foram determinadas pelas suas atividades, enquanto que as posições de eluição do *Blue dextran*, albumina bovina, citocromo c e catalase foram determinadas medindo-se as absorbâncias a 625nm, 280nm, 412nm e 405nm, respectivamente, de acordo com ANDREWS¹⁰. O peso molecular aparente da GPDH foi estimado por interpolação de acordo com o método de ANDREWS¹⁰.

2.11. PONTO ISOELÉTRICO DA GPDH

A determinação do ponto isoelétrico foi realizada a 4°C em um aparelho de focalização isoelétrica *LKB 8.100*. Aproximadamente 6 mg de proteína foram aplicados à coluna e focalizados na faixa de pH de 5 a 11, de acordo com VESTERBERG¹⁹⁵. O sistema foi montado segundo o manual de *LKB* nº 8.100²⁹. A solução de enzima foi eletrofocalizada por 60 horas a 660 volts e o pH das frações foi medido utilizando-se um potenciômetro *Metrohm pH Meter E 520* equipado com microeletrodo *Metrohm EA 147*.

2.12. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Para a determinação da composição de aminoácidos da GPDH purificada, a enzima (6mg/ml) foi hidrolisada com HCl 6N mais 5% (v/v) de fenol 10% em água, à vácuo por 72 horas a 110°C, segundo o procedimento de STEWART & YOUNG¹⁸². A análise dos aminoácidos foi feita com um analisador automático de aminoácidos.

2.13. PREPARAÇÃO DA APOENZIMA

O NAD ligado à proteína-enzima foi removido pelo método descrito por FUJITA et al.⁶⁴. A enzima em solução de sulfato de amônio foi dialisada *overnight* em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM. 1 ml da enzima dialisada (aproximadamente 6 mg) foi misturado com 100 mg de carvão ativo. A mistura foi agitada por 60 minutos em banho de gelo e a seguir passada através de um filtro *Millipore* e o filtrado foi usado como apoenzima.

2.14. INATIVAÇÃO DA GPDH POR ATP, A 0°C

As condições descritas por CONSTANTINIDES & DEAL³⁵ foram usadas para estudar o efeito do ATP na atividade da GPDH de músculo de réptil. Alíquotas da suspensão de sulfato de amônio, contendo a enzima, foram centrifugadas a 12.000 x g por 30 minutos e o precipitado foi suspenso em 1 ml do solvente de dissociação. O solvente de dissociação era composto de tampão Imidazol - HCl 0,1M, pH 7,0, contendo 2-mercaptoetanol 100mM e ATP nas quantidades indicadas. A incubação foi feita a 0°C no tempo indicado e a medida da atividade foi feita à temperatura ambiente.

2.15. INATIVAÇÃO DA GPDH POR NADH E G3P

A solução de enzima foi dialisada *overnight* em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0. Holo ou ApoGPDH, na concentração 10 μ M foi inativada a 37°C, em presença de NADH (0,05mM ou 0,5mM) ou gliceraldeído-3-fosfato (0,5mM). NAD, nas concentrações 0,05mM ou 0,5mM e 2-mercaptoetanol 1mM, quando era o caso, foram adicionados à mistura de incubação, para verificação de seu efeito protetor em relação à inativação pelo substrato. A intervalos de tempo, alíquotas da mistura de incubação foram retiradas e a atividade enzimática foi testada.

2.16. EFEITO DA URÉIA NA INATIVAÇÃO DA GPDH DE MÚSCULO DE *CAIMAN SP*

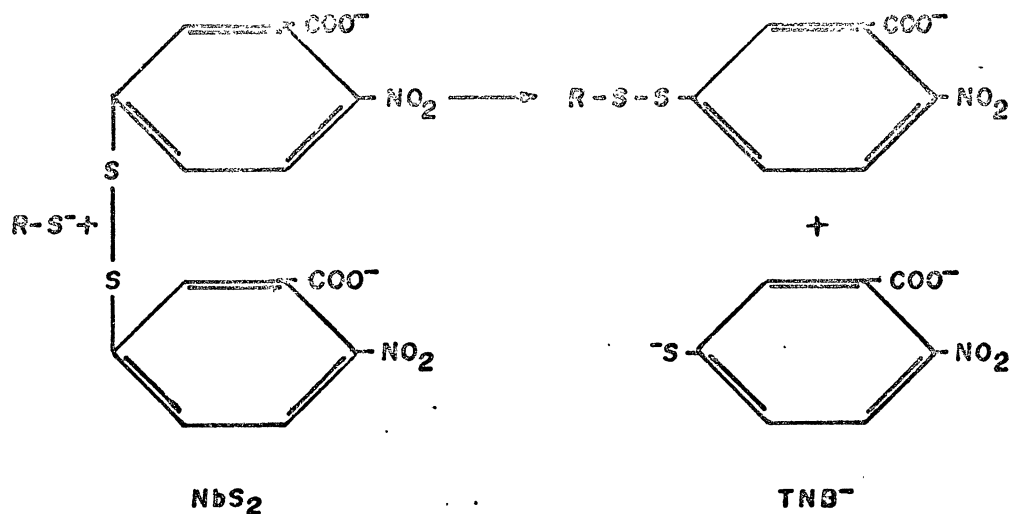
A GPDH de músculo de *Caiman sp* foi centrifugada e o precipitado foi suspenso em tampão Imidazol-HCl 0,05M, pH 7,0, contendo EDTA 5mM e 2-mercaptoetanol 1mM. A solução de enzima foi diluída 10 vezes em tampão Imidazol-HCl 0,05M, pH 7,0, contendo EDTA 5mM e 2-mercaptoetanol 1mM e uréia em concentrações variáveis.

A reassociação da enzima foi feita diluindo-se a mistura uréia-enzima cem vezes no tampão acima citado, porém

sem uréia, e incubando-se por 60 minutos à temperatura ambiente.

2.17. TITULAÇÃO DOS GRUPOS-SH COM Nbs_2

A titulação dos grupos-SH com ácido 5,5' ditiobis(2-nitrobenzôico) foi realizada de acordo com o método descrito por ELLMAN⁵⁶. O Nbs_2 reage especificamente, a pH 8,0, com compostos tiólicos alifáticos dando um mol de íon tionitrobenzoato (TNB^-) por mol de tiol, de acordo com a reação seguinte:



Desde que Nbs_2 absorve a 330 nm e o produto, altamente colorido, TNB^- apresenta um máximo de absorção a 412 nm ($E_M = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ele pode ser usado para medir a

concentração do tiol.

2.17.1. DOSAGEM DOS GRUPOS-SH RÁPIDOS

Para a dosagem dos grupos-SH rápidos, a enzima na concentração de 0,6 a 0,8 mg/ml dialisada *overnight* em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, contendo EDTA 1mM foi incubada com excesso de Nbs₂ (aproximadamente 0,4 mM) em cubetas de 1 ml, à temperatura ambiente. A absorbância a 412 nm da reação de *burst* foi anotada.

2.17.2. DOSAGEM DOS GRUPOS-SH TOTAIS

Para a dosagem dos grupos-SH totais, a quantidade apropriada da enzima (0,2 a 0,4 mg/ml) foi incubada por 1 minuto, à temperatura ambiente, em um sistema de incubação contendo EDTA 1mM e uréia 8M em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0. A reação foi iniciada pela adição de Nbs₂ (aproximadamente 0,4mM). A absorbância de um branco contendo tampão, Nbs₂ e uréia foi continuamente subtraída da absorbância da cubeta contendo a mistura de reação.

3. RESULTADOS

3.1. PURIFICAÇÃO DA GPDH DE MÚSCULO DE *CAIMAN SP*

A GPDH de músculo de réptil foi purificada através de precipitação fracionada com sulfato de amônio, segundo o método descrito por CORI et al.³⁹. Utilizando-se este método, purificou-se a enzima cerca de 57 vezes, com um rendimento de cerca de 16%. Uma atividade específica de 80 foi obtida para a enzima purificada sob as condições de ensaio. Tentativas para aumentar o grau de purificação através de cromatografia em DEAE-Sephadex, filtração em gel sephadex G-150, não aumentou significativamente a atividade específica.

A GPDH foi obtida como um precipitado amorfo em sulfato de amônio. Embora ela não tenha sido cristalizada, a preparação obtida era pura e homogênea como indicado por eletroforese (Figs. 1 e 2). A GPDH purificada era estável por aproximadamente um ano quando conservada na solução de sulfato de amônio, como descrito em *Materiais e Métodos*.

3.2. HOMOGENEIDADE

Na eletroforese em celogel, tanto em pH 5,8 como em pH 8,6, obteve-se uma banda única, espessa, porém com limites definidos, migrando para o pólo negativo, demonstrando ser a GPDH de músculo de réptil uma proteína básica (Figura não mostrada).

A homogeneidade da preparação enzimática foi também testada por eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas¹¹⁰, dando como resultado uma única banda (Fig. 1). O método convencional descrito por ORNSTEIN¹⁴³ e DAVIS⁴⁶ para eletroforese em gel de poliacrilamida, não deu bons resultados para a GPDH de *Caiman sp* (provavelmente devido a seu alto ponto isoelétrico). Neste caso obtivemos uma banda única, porém muito larga, que migrava muito pouco em tampão borato, pH 9,0 (Fig. não mostrada).

3.3. PROPRIEDADES ÓTICAS E CONTEÚDO DE NAD

Os dados espectrais da Holo e Apoenzima são mostrados na tabela I. A holoGODH purificada apresenta um valor máximo de absorção a 278 nm (Fig. 3) e a apoenzima apresenta um máximo a 280 nm (Fig. 4). A razão $A_{280} : A_{260}$ é de 1,2 para a holoenzima e de 2,1 para a apoenzima indicando um

conteúdo de 3,0 moles de NAD/mol de enzima e zero moles de NAD, respectivamente.

3.4. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

O peso molecular da enzima foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS e filtração em gel sephadex G-150.

A eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS resultou em uma única banda (Fig. 2) correspondendo a um peso molecular de aproximadamente 36.000, para a subunidade, usando-se *Hemoglobin, cross-linked* como marcador (Fig. 5). A partir dos resultados de filtração em gel, empregando-se sephadex G-150 (Fig. 6), o peso molecular aparente da enzima foi estimado em 140.000 daltons, sugerindo que a GPDH de *Caiman sp*, como a maioria das GPDH estudadas, tem estrutura tetramérica.

3.5. PONTO ISOELÉTRICO

O experimento de focalização isoeletrica foi realizado como descrito por VESTERBERG¹⁹⁵. Os resultados mostra-

dos na fig. 7, indicam que o ponto isoelétrico da GPDH de *Caiman sp* é de 8,9.

3.6. COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

A composição de aminoácidos da GPDH de músculo de *Caiman sp* é mostrada na tabela II onde ela é comparada com a composição de aminoácidos de vários outros organismos.

O método de hidrólise utilizado não permite distinguir quantitativamente o ácido aspártico da asparagina e o ácido glutâmico da glutamina, pois as amidas se transformam nos ácidos correspondentes durante a hidrólise ácida. Não foi possível quantificar a histidina e a arginina pois os picos de eluição destes aminoácidos foram encobertos pelo pico da amônia que aparece como contaminante. Também não foi possível quantificar a prolina e metionina, porque estes aminoácidos aparecem em baixas quantidades e a concentração de proteína na amostra testada foi insuficiente. O triptofano não pode ser analisado devido ao método de hidrólise utilizado.

3.7. EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da GPDH em função do pH é mostrada na

fig. 8. Usando-se um sistema com tampão Tris-HCl, o pH ótimo da enzima foi de 8,0.

3.8. EFEITO DO ARSENIATO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A ativação da GPDH por arseniato foi estudada nas condições de ensaio, em que diferentes concentrações de arseniato foram usadas (nestas condições o pH do meio não sofreu variação). Como demonstrado na fig. 9, a concentração ótima de arseniato é de 50mM.

3.9. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO, DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN

O efeito da concentração de G3P sobre a velocidade da reação é mostrado na fig. 10. O valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) para o G3P, calculado segundo o método de LINEWEAVER-BURK¹¹⁶ foi de 70 μ M, em pH 8,0 e a 25°C.

3.10. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NAD^+ . DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN

O efeito da concentração de NAD^+ sobre a velocidade da reação é apresentado na fig. 11. O valor da constante de Michaelis-Menten, para o NAD^+ , calculado segundo o método de LINEWEAVER-BURK¹¹⁶ foi de $15\mu\text{M}$, em pH 8,0, a 25°C .

3.11. EFEITO INIBITÓRIO DO PRODUTO DA REAÇÃO, NADH, SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A fig. 12 mostra o efeito inibitório do NADH, com relação ao NAD^+ , em presença de G3P em concentração saturante. A inibição foi demonstrada ser o tipo competitivo e o valor da constante de inibição (K_i), calculado da intersecção com o eixo das abcissas foi de $38\mu\text{M}$, a pH 8,0 e a 25°C .

3.12. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE *CAIMAN SP*

O efeito de vários íons metálicos (na concentração 1mM) sobre a atividade da enzima foi estudado. A enzima foi

pré-incubada, a 25°C, por 10 minutos, em presença do respectivo íon metálico e na ausência de G3P. Os resultados são mostrados na tabela III. Observou-se que os íons Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} não afetam significativamente a atividade da GPDH. Os íons Zn^{++} , Hg^{++} e Cu^{++} inibem totalmente a atividade enzimática. A inibição por íons cúprico e mercúrio sugerem a presença de grupos sulfidrílicos no sítio ativo da enzima, mas a inibição por íons Zn^{++} não foi esclarecida.

3.13. EFEITO DE REAGENTES SULFIDRÍLICOS NA ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE *CAIMAN SP*

O efeito de reagentes sulfidrílicos foi estudado no sistema de ensaio, na ausência de 2-mercaptoetanol. A enzima foi dialisada *overnight* em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, contendo EDTA 1mM. A enzima dialisada foi previamente incubada, por 10 minutos, a 25°C, na presença dos mercuriais em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 contendo EDTA na concentração 1mM. Os resultados do efeito destes mercuriais sobre a atividade da GPDH, bem como o efeito de 2-mercaptoetanol na reversão desta inibição são mostrados na tabela IV. Observamos que todos os mercuriais testados inibem a atividade da GPDH. Dentre eles, o inibidor mais potente é o p-hidroximercuribenzoato, inibindo 100% a atividade enzimática. Esta inibição, no entanto, é totalmente revertida pela adição

subsequente de um excesso de 2-mercaptoetanol. Iodoacetamida inibe cerca de 67,5% da atividade enzimática, não sendo esta inibição revertida por 2-mercaptoetanol. Isto é esperado uma vez que o mecanismo de inibição por iodoacetamida é diferente dos anteriores, ligando-se o reagente, covalentemente aos grupos-SH da enzima e portanto não sendo deslocado pelo agente redutor.

3.14. INATIVAÇÃO DA GPDH DE MÚSCULO DE *CAIMAN SP* POR ATP, A 0°C.

A inativação da GPDH de músculo de réptil, em presença de ATP, a 0°C, em função da concentração de proteína é mostrada na fig. 13. Podemos observar que a GPDH é inativada nestas condições e que quanto menor a concentração de proteína, maior o efeito do ATP na inativação. A incubação da enzima, numa concentração de 90 µg/ml, com ATP 10 mM resultou numa inativação de cerca de 80%, quando a incubação foi por uma hora e 90% quando a enzima foi incubada por 22 horas.

A inativação da GPDH por ATP a 0°C, pode ser parcialmente revertida por incubação da enzima inativada, à temperatura ambiente. Nestas condições a amostra citada acima, que se encontrava 90% inativada, recuperou 63% da atividade enzimática original, quando incubada por 30 minutos,

à temperatura ambiente. Por outro lado, uma amostra (0,45 mg/ml) 60% inativada, por incubação com ATP 10 mM por uma hora, recuperou aproximadamente 90% da atividade original, nas mesmas condições.

3.15. INIBIÇÃO DA GPDH DE MÚSCULO DE *CAIMAN SP* POR 3'-5'-AMP_C, 5'-AMP, ADP E ATP

Como mostrado na fig. 14, os nucleotídeos de adenina inibem a atividade da GPDH, sendo 3'-5'-AMP_C, o inibidor mais eficaz, seguido por 5'-AMP, ADP e ATP, respectivamente. O 3'-5'-AMP_C produz cerca de 15% de inibição da atividade enzimática na concentração 1mM e aproximadamente 50%, na concentração 10 mM.

A fig. 15 mostra o efeito inibitório dos nucleotídeos de adenina com relação ao NAD, em presença de G3P em concentração saturante. A inibição foi demonstrada ser do tipo competitivo com relação ao NAD e os valores da constante de inibição (K_i) calculados da intersecção com o eixo das abcissas foram de 0,5mM, 1,3mM, 1,5mM e 6,1mM para 3'-5'-AMP_C, 5'-AMP, ADP e ATP, respectivamente.

3.16. TITULAÇÃO DOS GRUPOS-SH

Os resultados obtidos pela titulação dos grupos-SH

da enzima, pelo método de ELLMAN⁵⁶, indicam que há 13,8 grupos-SH por mol de enzima. Dentre eles, aproximadamente 4 grupos reagem rapidamente, correspondendo provavelmente aos grupos sulfidrílicos que fazem parte do sítio ativo da enzima, o restante deles reagem lentamente com Nbs₂ e são titulados em presença de uréia (8M).

3.17. ESTABILIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE *CAIMAN SP*

Holo e apo GPDH dialisadas em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, foram mantidas em geladeira, a aproximadamente 4°C. Observou-se que, nestas condições, a enzima é bastante estável, porém tendendo com o tempo, a flocular e precipitar. A apoenzima de músculo de *Caiman sp* apresenta como particularidade uma grande estabilidade, sendo quase tão estável quanto sua respectiva holoenzima. Após 2 meses a holoenzima retém ainda 98% da atividade inicial e a apoenzima 90%.

3.18. EFEITO DE 2-MERCAPTOETANOL E DITIOERITRITOL NA ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE *CAIMAN SP*

A GPDH de músculo de *Caiman sp* é ativada quando in-

cubada em presença de 2-mercaptoetanol e ditioeritritol em concentrações baixas. A fig. 16 mostra o efeito de ativação dos grupos sulfidrílicos, como uma função da concentração de 2-mercaptoetanol e ditioeritritol na mistura de incubação. A enzima foi dialisada em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, contendo EDTA na concentração 1mM. À mistura de incubação foram acrescentadas quantidades variáveis do agente redutor e a atividade enzimática foi medida imediatamente após a adição. Pela figura podemos constatar que 2-mercaptoetanol e ditioeritritol ativam a GPDH de réptil e que em ambos os casos na concentração de 10mM a enzima mostrou uma atividade máxima. Se a concentração do agente redutor for aumentada acima deste valor, a ativação diminui, e no caso de 2-mercaptoetanol, na concentração de 100mM, nenhum efeito de ativação pode ser observado.

3.19. INATIVAÇÃO DA ENZIMA POR NADH A 37°C

3.19.1. HOLOENZIMA

A estabilidade da GPDH frente à incubação a 37°C e a inativação da holoenzima por NADH é mostrada na tabela V. Também é mostrada a influência de EDTA nesta inativação. Analisando-se os dados da tabela, observa-se que a holoenzima (10 μ M) sofre inativação espontânea quando incubada a

37°C. Aproximadamente 30% de inativação é observado quando a enzima é incubada por 20 horas, a 37°C. A presença de EDTA (1mM) parece proteger muito pouco a enzima, nestas condições. Quando a enzima foi incubada na presença de NADH 0,5mM, observou-se uma inativação da ordem de 98%, na ausência de EDTA 1mM, e de 88% na presença deste composto. Demonstrou-se também que NAD 0,5mM não tem qualquer efeito protetor em relação à inativação por NADH, mas 2-mercaptoetanol protege a enzima.

A fig. 17 mostra o efeito de inativação por NADH, sobre a atividade da holoGPDH, em função do tempo. Podemos notar que após 5 horas de incubação em presença de NADH, na concentração 0,05mM, a enzima apresenta uma inativação da ordem de 40%, entretanto, se a concentração de NADH for de 0,5mM a enzima apresenta uma inativação de 80%. NAD, nas concentrações testadas não demonstrou ter qualquer efeito protetor em relação à inativação da enzima por NADH, porém 2-mercaptoetanol, na concentração 1mM, protege a enzima.

3.19.2. APOENZIMA

A fig. 18 mostra o efeito de inativação por NADH, sobre a atividade de apoGPDH de músculo de *Caiman sp*, em função do tempo. Observamos que a apoenzima também é inativada quando incubada em presença de NADH, a 37°C. Analisando-se

as figs. 17 e 18, concluímos que aparentemente a holo e apo-GPDH comportam-se de maneira semelhante em relação à inativação por NADH, a 37°C. Após uma hora de incubação tem-se aproximadamente 27% de inativação e após 5 horas, 80% de inativação, tanto para a holoenzima como para a apoenzima. Observamos que a enzima inativada por NADH, após 5 horas de incubação, tem aproximadamente 60% dos grupos-SH em relação ao controle, também incubado por 5 horas a 37°C, na ausência de NADH.

3.20. INATIVAÇÃO DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE POR G3P, A 37°C

3.20.1. HOLOENZIMA

A holoenzima de músculo de *Caiman sp* é inativada quando incubada a 37°C, em presença de gliceraldeído-3-fosfato (0,5mM) (Fig. 19). Podemos observar que a inativação por G3P não é tão eficaz quanto à inativação por NADH. A presença de NAD não tem qualquer efeito protetor em relação a esta inativação, porém 2-mercaptoetanol (1mM) parece proteger a enzima, também no caso da inativação por gliceraldeído-3-fosfato.

3.20.2. APOENZIMA

A fig. 20 nos mostra que a apoenzima também é inativada quando incubada a 37°C, em presença de G3P (0,5mM). É bastante interessante o fato que a apoenzima de músculo de réptil aparentemente é mais estável que a holoenzima, em relação à inativação por gliceraldeído-3-fosfato (0,5mM). Após 5 horas de incubação obteve-se aproximadamente 60% de inativação para a holoenzima e 40% de inativação para a apoenzima, em presença de gliceraldeído-3-fosfato, na concentração 0,5mM.

3.21. EFEITO DA URÉIA NA INATIVAÇÃO DA GPDH DE MÚSCULO DE *CAIMAN SP*

Este estudo foi realizado para se saber se a enzima de réptil sofre reassociação espontânea para sua forma ativa, depois de inativada por uréia, de maneira similar às outras enzimas estudadas.

Analisando-se a fig. 21, podemos observar que praticamente toda a atividade enzimática é perdida em concentrações de uréia superiores a 4M. Quando a enzima inativada é diluída cem vezes, para reduzir a concentração de uréia a valores mínimos, e incubada à temperatura ambiente, ela não recupera quantidades apreciáveis de sua atividade original,

mesmo tratando-se da holoenzima, isto é, apresentando o coenzima ligado.

3.22. ESTUDO DA LIGAÇÃO DO COENZIMA À APOGPDH DE *CAIMAN SP*. TITULAÇÃO PELA BANDA DE RACKER

ApoGPDH de *Caiman sp* foi preparada como descrito em *Materiais e Métodos*. À cubeta de 1 ml contendo apoenzima na concentração 9,6 μM , suspensa em tampão Tris-HCl 0,05mM, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM, foram acrescentadas quantidades crescentes de NAD^+ e a absorbância relativa ao complexo NAD^+ -enzima (Banda de Racker) foi medida a 360 nm como função do NAD^+ acrescentado (Fig. 22).

Analisando-se a fig. 22 observamos que o ponto de intersecção na titulação com a enzima de réptil foi encontrado em 4 moles de NAD^+ /mol de enzima.

TABELA I - Dados espectrais.

Parâmetro	Apoenzima	Holoenzima
$\lambda_{\max.}$ (nm)	280	278
$A_{280}^{0,1g\%}$	1,05	0,9
$A_{280} : A_{260}$	2,1	1,2

Os valores de $\lambda_{\max.}$ foram retirados das figs. 3 e 4. O coeficiente de extinção da apo e holoGPDH foi calculado segundo a técnica descrita em *Materiais e Métodos*.

TABELA II - Composição de aminoácidos da GPDH de músculo de *Caiman sp* e comparação com enzimas isoladas de outras fontes.

Aminoácido	<i>Caiman sp</i>	Porco 85	Rato 134	Lagosta 45	Levedura 93	<i>T. thermophilus</i> 64
mol/mol de monômero						
Lisina	31	26	26	28	26	19
Histidina	--	11	6	5	8	8
Arginina	--	10	10	9	11	17
Ac. Aspártico	37	38	41	32	37	31
Treonina	22	22	19	20	23	23
Serina	22	19	19	25	24	12
Ac. Glutâmico	23	18	22	24	22	26
Prolina	--	12	14	12	13	6
Glicina	34	32	32	30	19	37
Alanina	32	32	32	32	33	39
Cisteína	4	4	4	5	2	1
Valina	22	34	32	38	36	30
Metionina	--	9	8	10	6	5
Isoleucina	21	21	17	18	19	18
Leucina	17	18	21	18	22	33
Tirosina	9	9	11	9	10	9
Fenilalanina	12	14	13	15	10	7

Para a determinação de composição de aminoácidos, a GPDH de *Caiman sp* purificada foi hidrolisada com HCl 6 N mais 5% (v/v) de fenol 10% em água, à vácuo por 72 horas a 110°C.

TABELA III - Efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade da GPDH de músculo de *Caiman sp.*

Sal (1 mM)	Atividade relativa %
nenhum	100,0
CaCl_2	109,0
MnCl_2	96,5
MgCl_2	94,0
CuCl_2	0
HgCl_2	0
ZnCl_2	0

A enzima foi pré-incubada em presença do íon metálico, por 10 minutos, a 25°C, na ausência de G3P e a seguir a atividade enzimática foi determinada em um sistema de incubação contendo em 1 ml: tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD^+ 1mM, G3P 1mM e 1 a 2 μg de proteína.

TABELA IV - Efeito de reagentes sulfidrílicos na atividade da GPDH de músculo de *Caiman sp.*

Reagente (0,1 mM)	Atividade relativa ^a %	Atividade relativa em presença de 2-mercaptoetanol (5 mM) ^b - %
nenhum	100,0	100,0
2-cloro-4-aminobenzoato	60,4	100,0
iodoacetamida	32,5	32,5
ácido ortoiodoso benzóico	25,5	100,0
ácido p-cloromercuribenzóico	12,7	100,0
p-hidroxi-mercuribenzoato	0	100,0

a - A enzima foi incubada por 10 minutos a 25°C em presença dos reagentes em tampão Tris-HCl, 0,05 M pH 8,0, contendo EDTA 1mM. A atividade remanescente foi determinada como descrito na tabela III.

b - A mistura de incubação foi a mesma que em a, porém 2-mercaptoetanol na concentração 5 mM foi adicionado imediatamente antes do ensaio da atividade enzimática.

TABELA V - Estabilidade da GPDH de músculo de *Caiman sp* a 37°C e efeito de EDTA na inativação da enzima por NADH.

Adição	Exp. 1 ^a		Exp. 2 ^b	
	% atividade inicial*	% inativação	% atividade inicial*	% inativação
Nenhuma	75	25	70	30
0,5mM NADH	12	88	2	98
0,5mM NADH + 0,5mM NAD	17	83	2,3	97,7
0,5mM NADH + 1mM 2-mercaptoetanol	70	30	66	34

a - 0,01 μ mol da enzima purificada (dialisada em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, contendo EDTA 1mM) foi incubado por 20 horas a 37°C em um sistema contendo tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 contendo EDTA 1mM, e em presença dos compostos citados acima.

b - 0,01 μ mol da enzima purificada (dialisada em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0) foi incubado por 20 horas a 37°C em um sistema contendo tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 em presença dos compostos citados acima.

* - a atividade inicial foi considerada em relação ao tempo zero de incubação.



Fig. 1: Eletroforese de disco em gel da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de *Caiman sp.*

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi desenvolvida em aparelho Ortec, mod. 4200, usando-se um sistema para proteínas básicas descrito por KUCHLER¹¹⁰, em géis de poliacrilamida na concentração de 7,5%, sendo de 20 μ g a concentração da amostra.

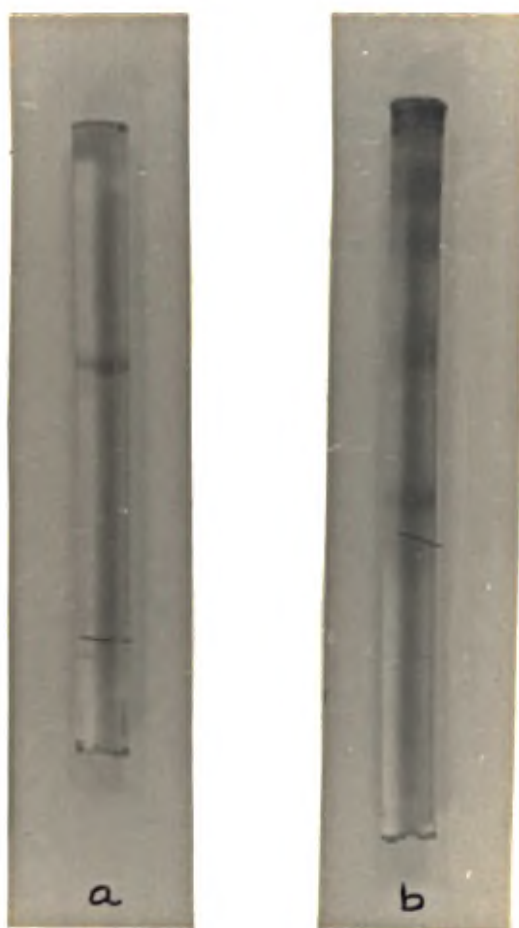


Fig. 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de *Caiman sp.*

A eletroforese em gel, na concentração de 10% de poliacrilamida, contendo 0,1% de SDS foi realizada de acordo com o método descrito por WEBER & OSBORN¹⁹² sendo aplicadas amostras contendo 10 µg de proteína. a - GPDH de músculo de *Caiman sp.* b - proteína marcadora: *Hemoglobin, cross-linked* considerando-se como 16.000, 32.000, 48.000 e 64.000 os pesos moleculares do monômero, dímero, trímero e tetrâmero, respectivamente.

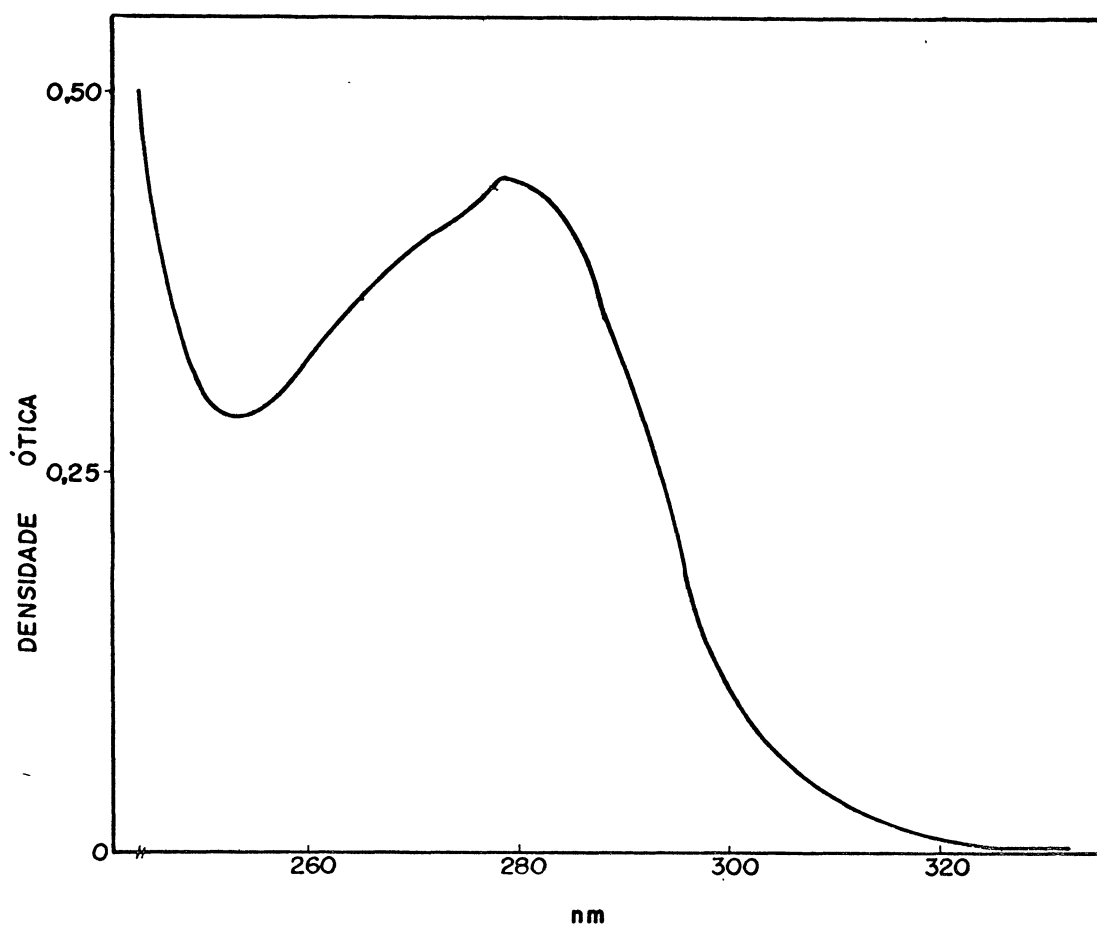


Fig. 3: Espectro de absorção ultravioleta da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de *Caiman sp* (Holoenzima).

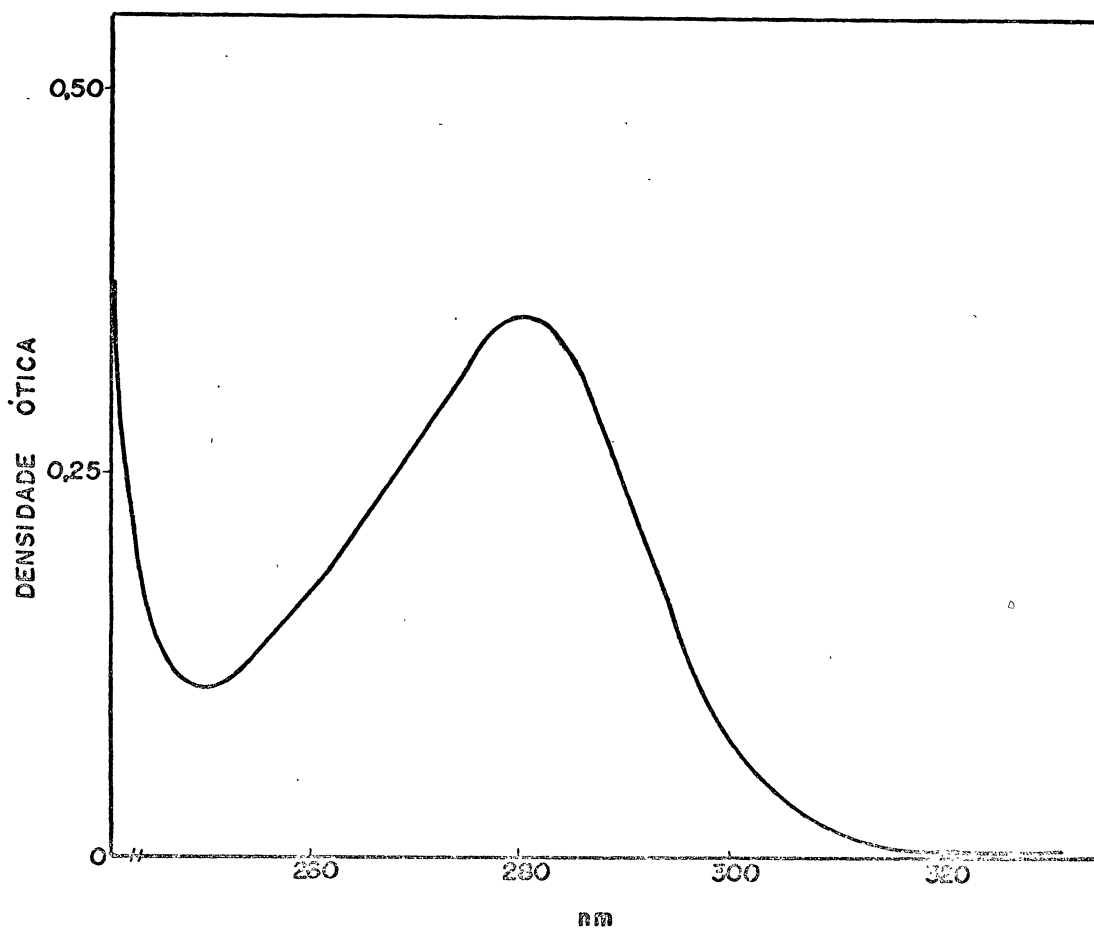


Fig. 4: Espectro de absorção ultravioleta da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de *Caiman sp* (Apoenzima).

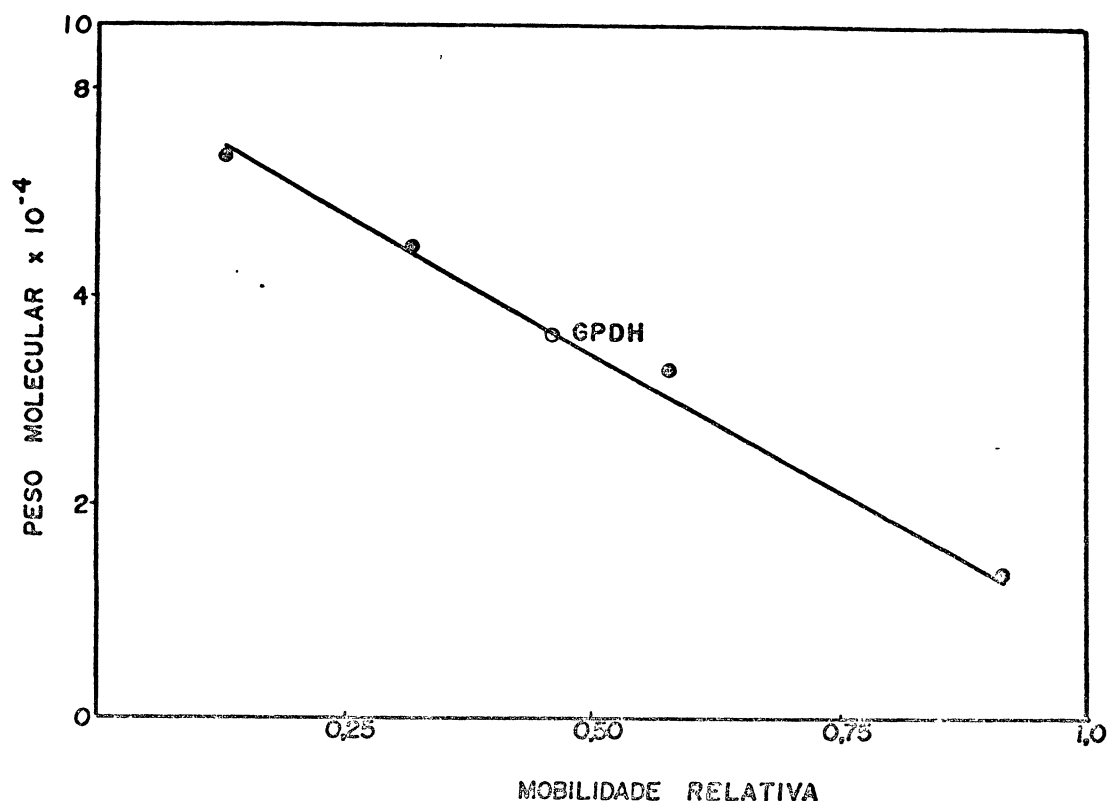


Fig. 5: Determinação do peso molecular da subunidade da GPDH de músculo de *Caiman sp* por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS.

Amostras de 10 μ g da enzima foram aplicadas a géis a 10% de poliacrilamida, na presença de 0,1% de SDS. Depois das proteínas serem submetidas à eletroforese por 5,30 h, com uma voltagem de 8mA/gel, foram coradas com *Brilliant Coomassie Blue*. A proteína usada como padrão para peso molecular foi *Hemoglobin, cross-linked*.

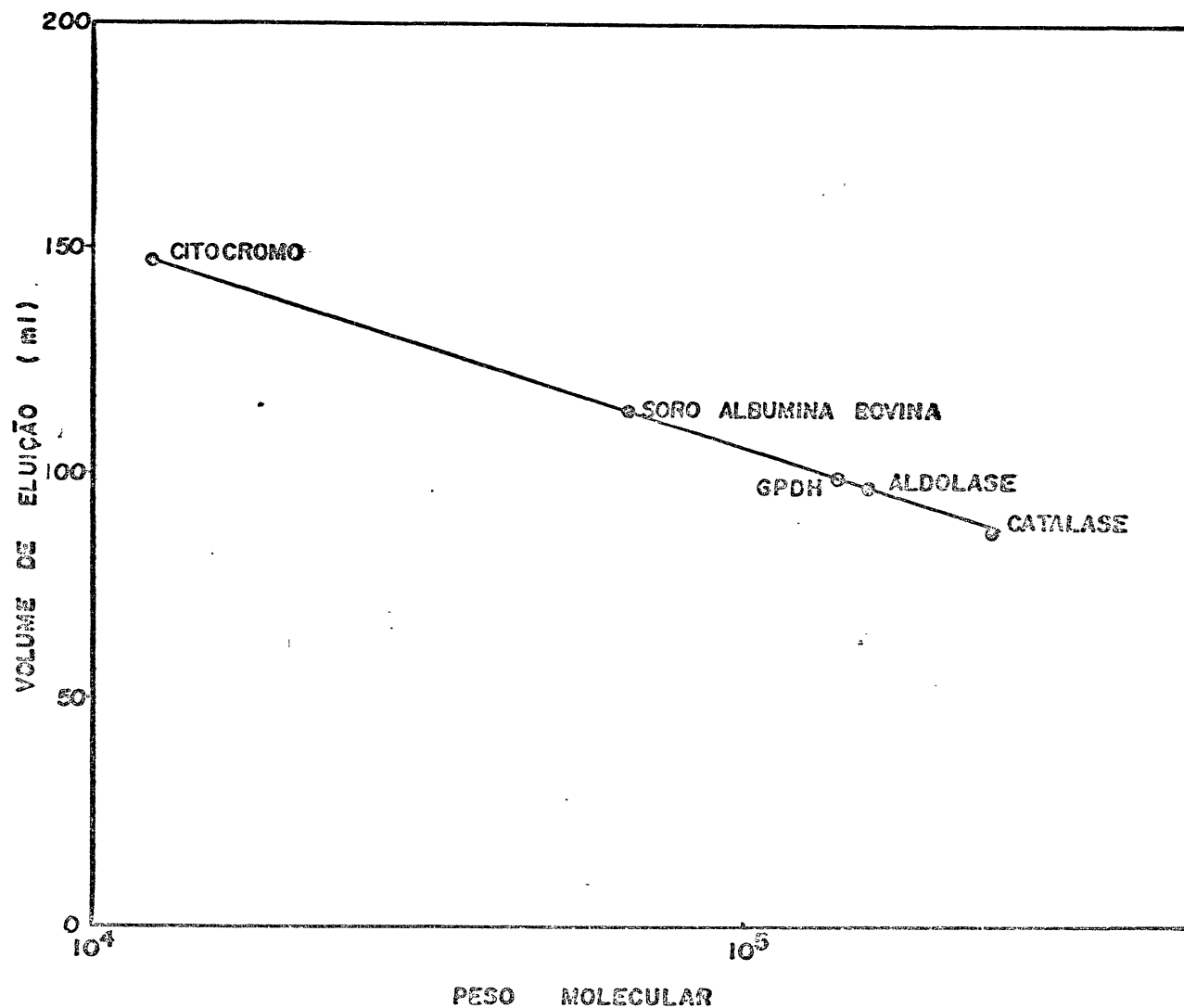


Fig. 6: Peso molecular aparente da GPDH de músculo de *Caiman sp* por filtração em gel Sephadex G-150.

Uma coluna de gel Sephadex G-150 (2,6 x 37 cm) foi equilibrada e eluída como descrito em *Materiais e Métodos*. O volume morto (57 ml) foi determinado com *Blue dextran* (PM = 2.000.000). A amostra aplicada continha 3 mg de proteína. As proteínas de peso molecular padrão eram: citocromo c (PM = 12.500); soro albumina bovina (PM = 67.000); aldolase (PM = 158.000) e catalase (PM = 240.000).

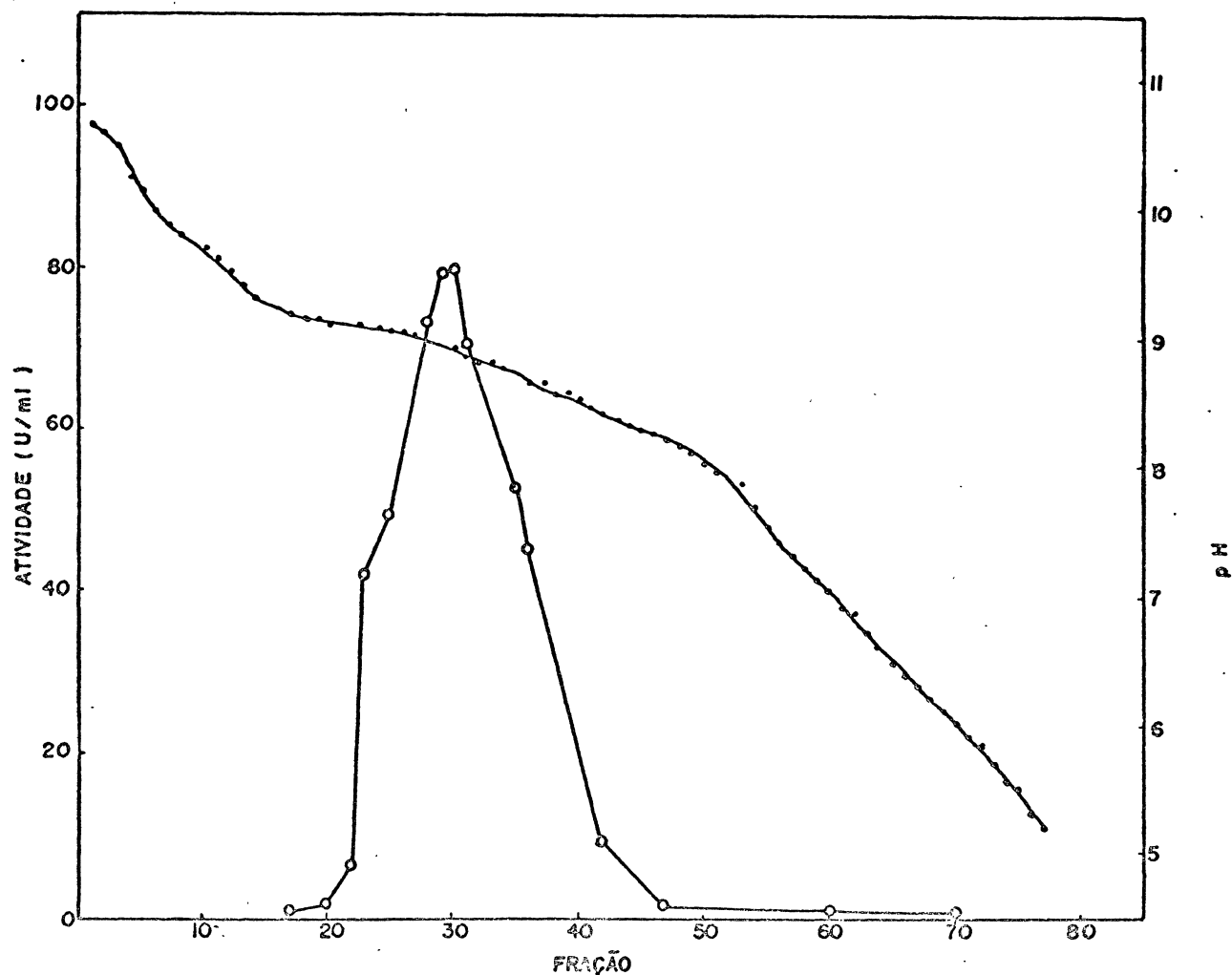


Fig. 7: Ponto isoelétrico da GPDH de músculo de *Caiman sp.*

O experimento de focalização isoelétrica foi realizado em uma coluna de eletrofocalização LKB 8.100. A enzima foi eletrofocalizada por 60 horas. Um potencial de 650 volts foi usado e a temperatura foi mantida à 4°C.
(o) - atividade; (•) - pH.

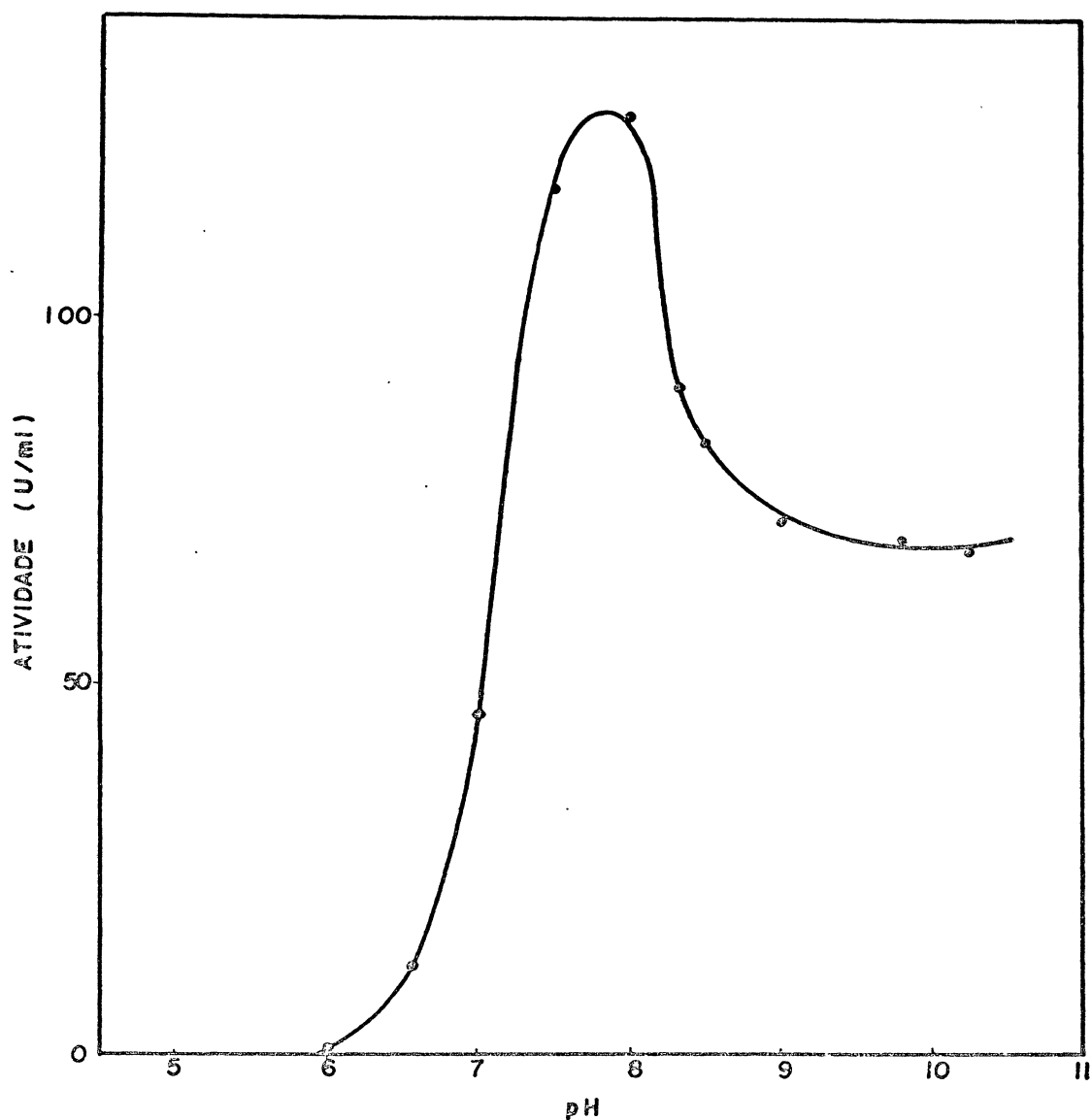


Fig. 8: Efeito do pH na atividade da GPDH de músculo de *Caïman sp.*

Os tampões empregados na concentração 47mM, foram: Tris/maleato (pH 6,1-7,3), Tris-HCl (pH 7,5-8,5) glicina/NaOH (pH 9,0-10,2). O ensaio foi realizado como descrito em *Materiais e Métodos*.

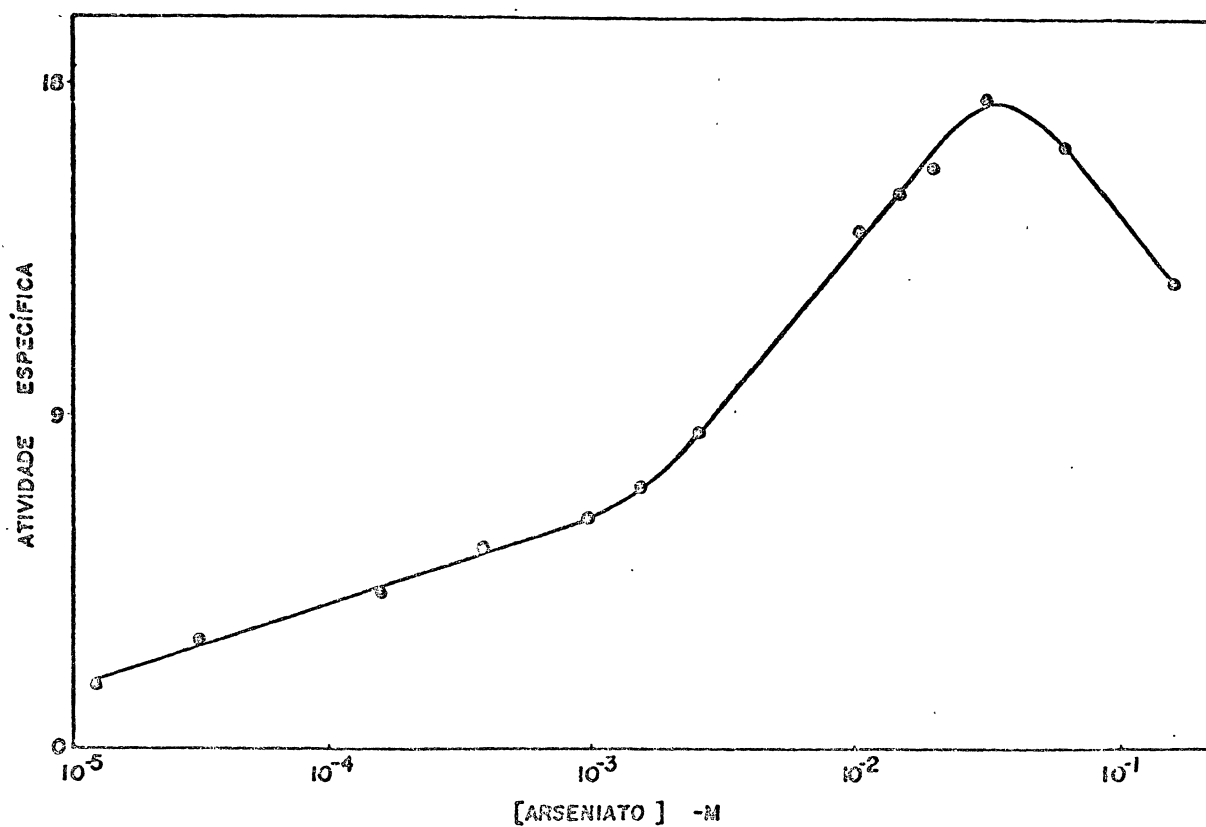


Fig. 9: Ativação da GPDH de músculo de *Caiman sp* por arseniato.

A mistura de incubação continha, em um volume final de 1ml: 2 μ g de enzima, Tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, NAD 1mM, G3P 1mM e quantidades variáveis de arseniato de sódio.

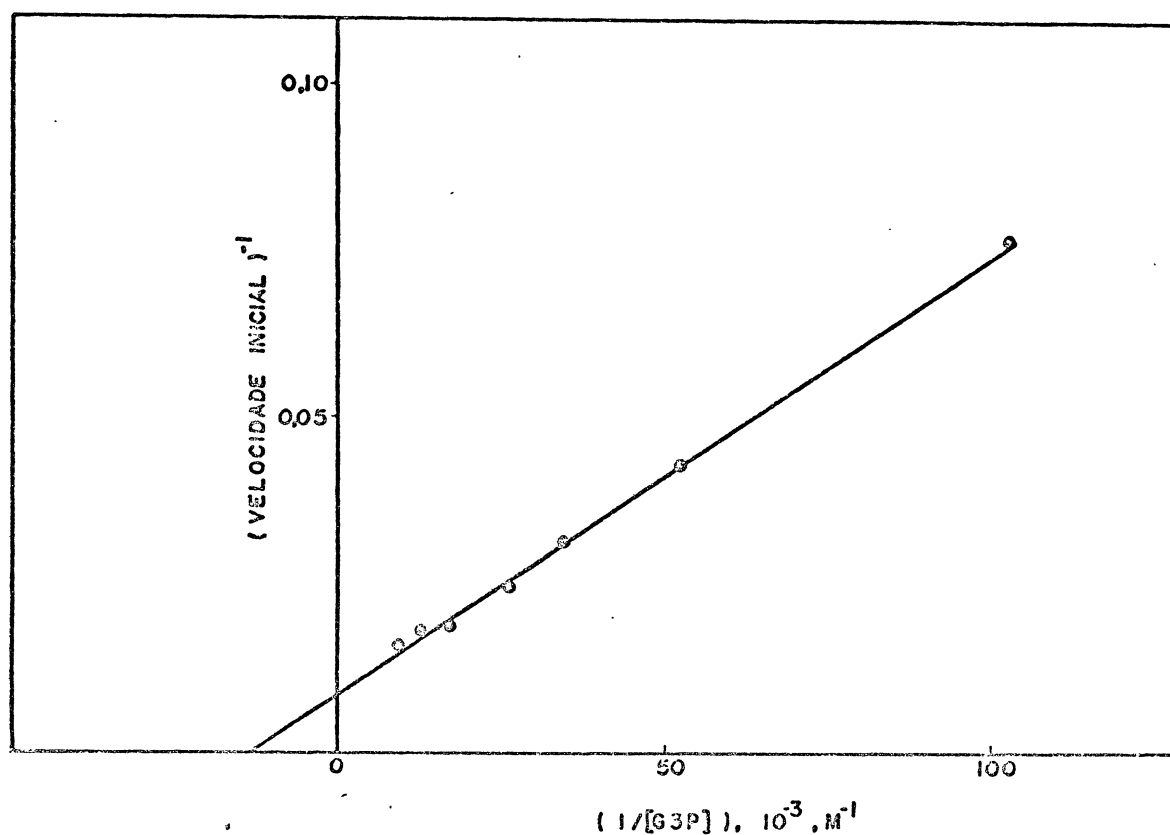


Fig. 10: Efeito da concentração de gliceraldeído-3-fosfato sobre a atividade da GPDH de músculo de *Caiman sp.* Determinação da constante de Michaelis-Menten.

A mistura de incubação continha os seguintes componentes, em um volume final de 1 ml: 1,0 μg de proteína, tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, 50 mM de arseniato de sódio, 1 mM de NAD e quantidades variáveis de G3P.

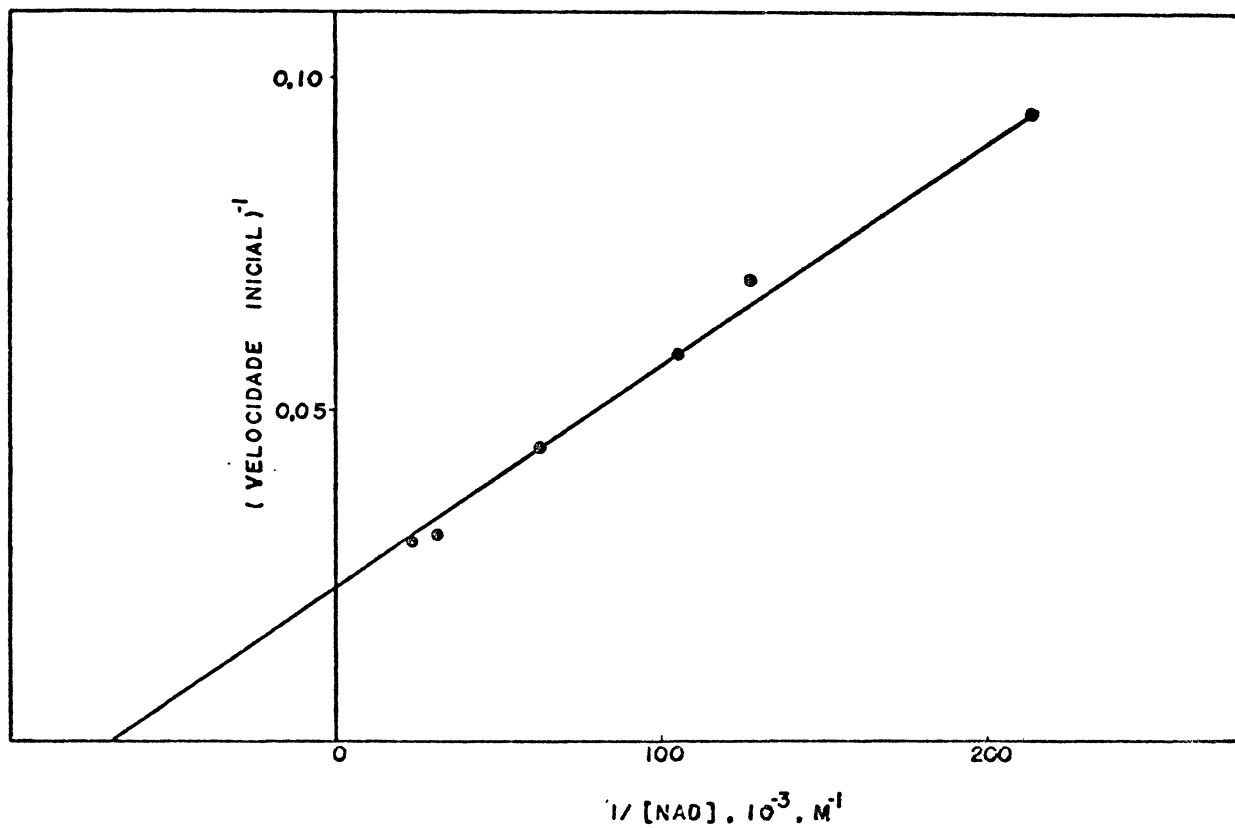


Fig. 11: Efeito da concentração do NAD^{+} sobre a atividade da GPDH de músculo de *Caiman sp.* Determinação da constante de Michaelis-Menten.

A mistura de incubação continha os seguintes componentes, em um volume final de 1 ml: 1,0 μg de proteína, tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, contendo EDTA, 1 mM e 2-mercaptoetanol 1mM, 50mM de arseniato de sódio, gliceraldeído-3-fosfato 1mM e quantidades variáveis de NAD.

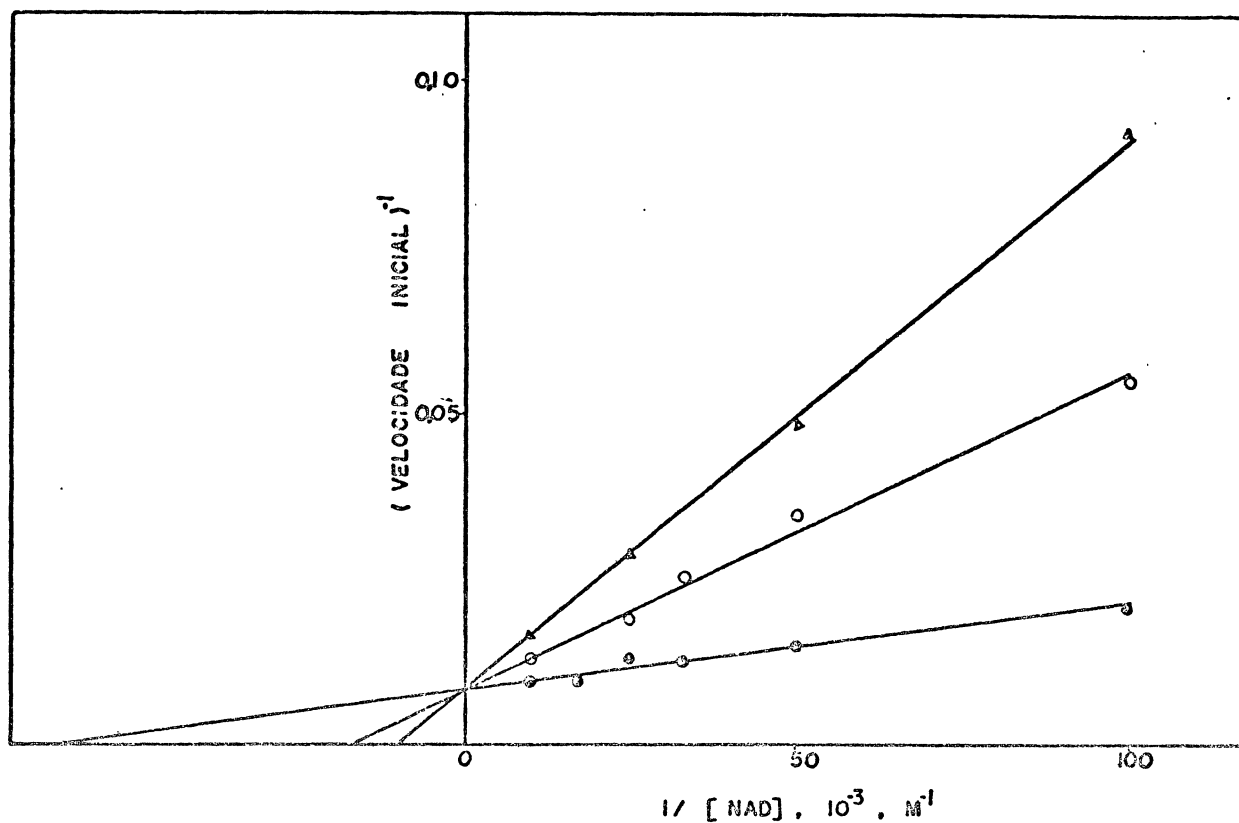


Fig: 12: *Plot* segundo Lineweaver-Burk da inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Caiman sp* por NADH, a pH 8,0 e a 25°C.

A mistura de incubação continha em um volume final de 1 ml: 1,0 μg de proteína, tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1mM, arseniato de sódio 50mM, quantidades variáveis de NAD e zero (○), 100 μM (◐) ou 200 μM (Δ) de NADH.

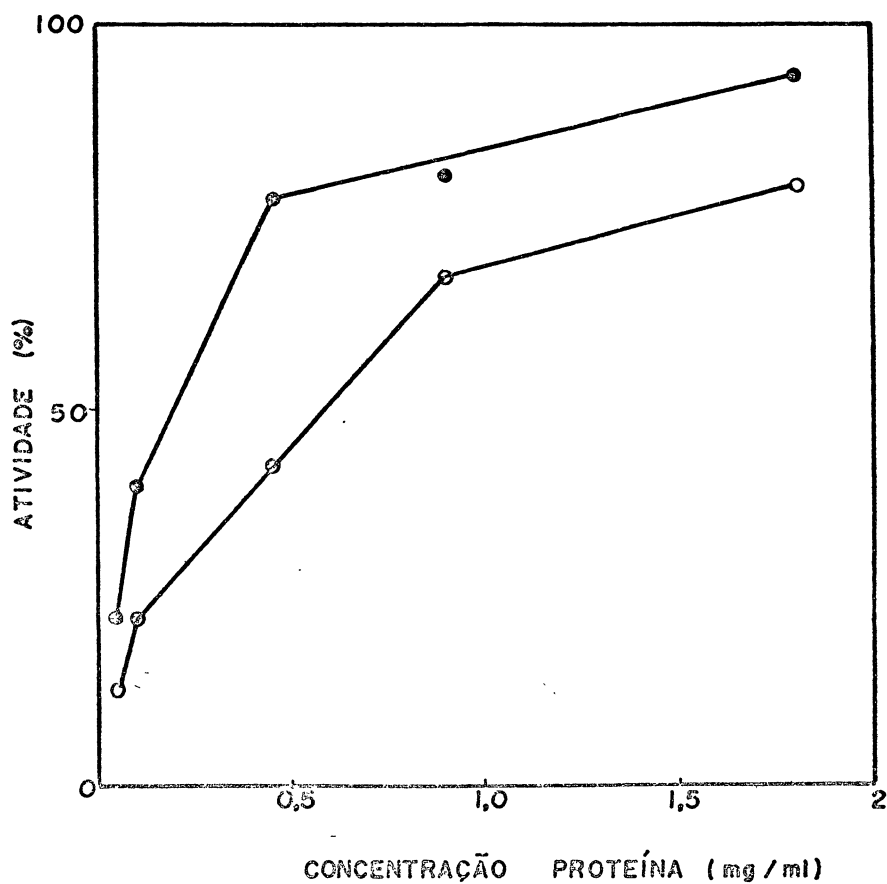


Fig. 13: Inativação da GPDH de músculo de *Caïman sp* por ATP a 0°C.

Alíquotas da enzima foram incubadas por uma hora a 0°C em tampão Imidazol-HCl 0,1 M contendo 2-mercaptoetanol 0,1M (pH 7,0), contendo ATP na concentração 1 (*) ou 10 (°)mM. As medidas da atividade foram realizadas com o sistema padrão, à temperatura ambiente.

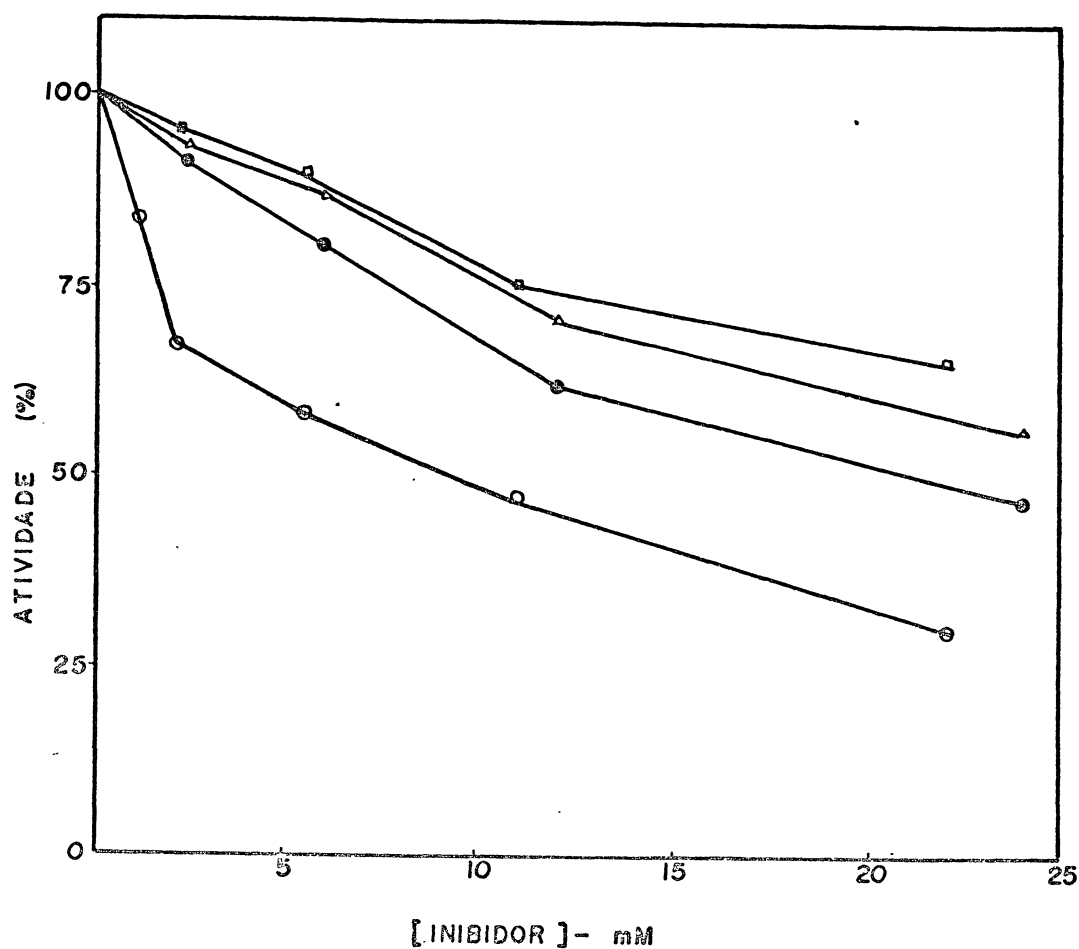


Fig. 14: Efeito de ATP (◻), ADP (Δ), 5'-AMP (◦) e 3'-5'-AMP cíclico (◉) sobre a atividade da GPDH de músculo de *Caiman sp.*

A mistura de incubação continha os seguintes componentes, em um volume final de 1 ml: 1,0 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, G3P 1mM, arseniato de sódio 50mM, NAD 1mM e quantidades variáveis do inibidor.

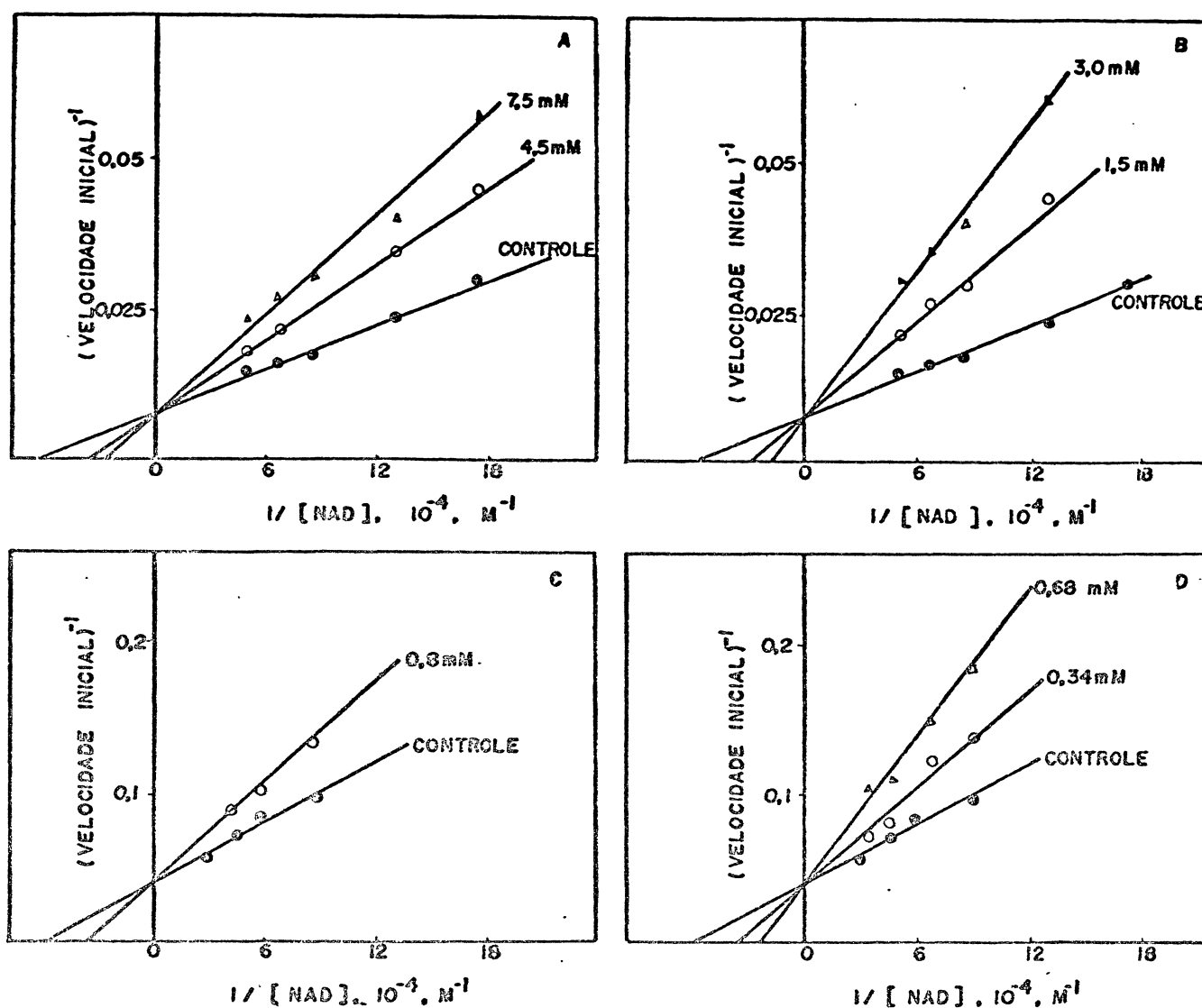


Fig. 15: Plots segundo Lineweaver-Burk da inibição da GPDH de músculo de *Caiman sp* por ATP (A), ADP (B), 5'-AMP (C) e 3'-5'-AMP cíclico (D).

A mistura de incubação continha os seguintes componentes em um volume final de 1 ml: 1,0 μg de proteína, tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, G3P 1mM, arseniato de sódio 50mM, quantidades variáveis de NAD e os nucleotídeos de adenina nas concentrações indicadas no gráfico.

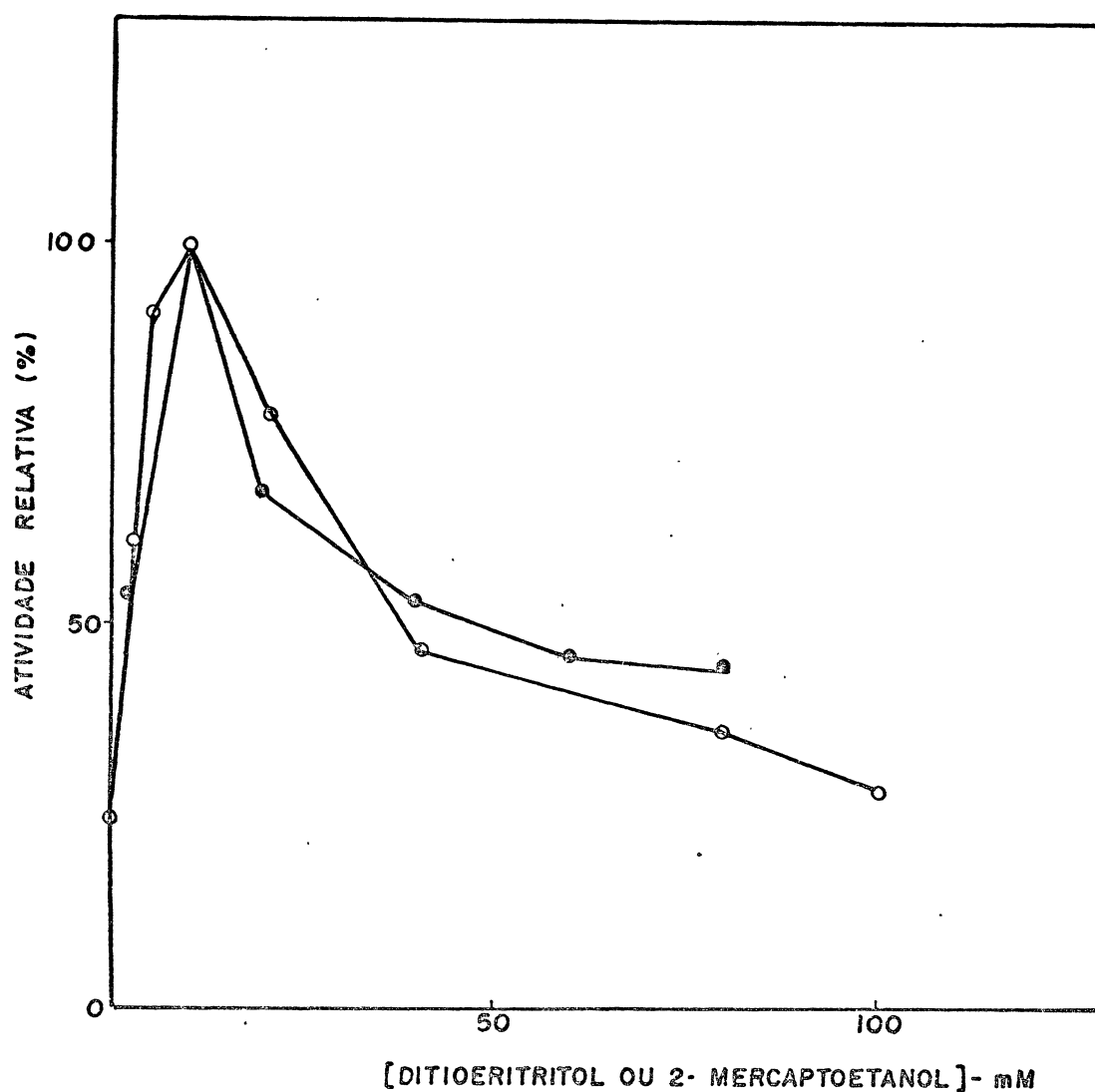


Fig. 16: Efeito de 2-mercaptoetanol e ditioeritritol na atividade da GPDH de músculo de *Caiman sp.*

O sistema de incubação continha em um volume final de 1 ml: 1 μ g de enzima dialisada, tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contendo EDTA 1mM, NAD 1mM, G3P 1mM, arseniato de sódio 50 mM e ditioeritritol (•) ou 2-mercaptoetanol (◦) nas concentrações indicadas. A medida da atividade foi feita imediatamente após a adição do agente redutor.

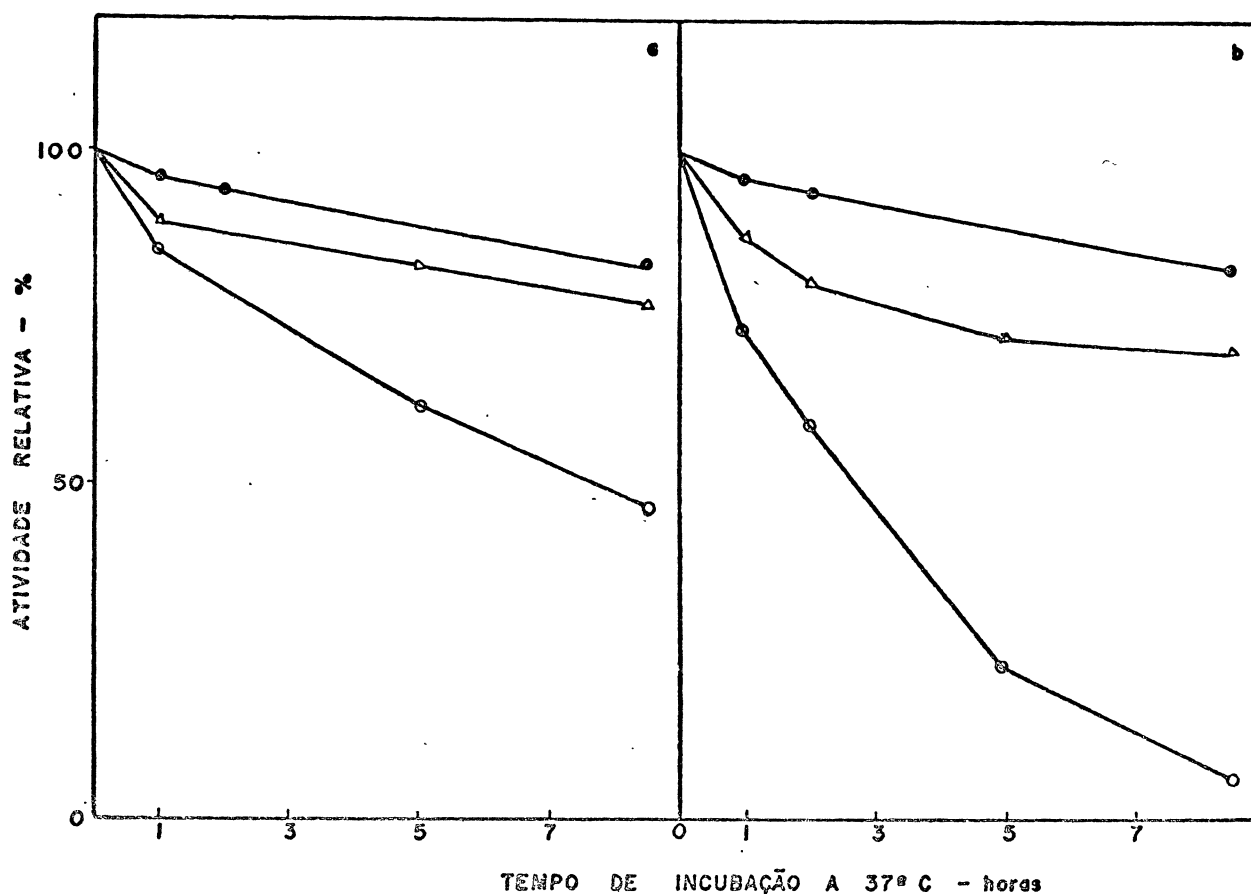


Fig. 17: Inativação da holoGPDH de músculo de *Caïman sp* por NADH.

A solução de enzima foi dialisada em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0. A enzima na concentração 10 μ M foi incubada a 37°C em presença de NADH na concentração 0,05mM (Fig. a) ou 0,5mM (Fig. b). Fig. a - (●) controle; (△) 0,05mM NADH + 1mM 2-mercaptoetanol; (○) - 0,05mM NADH ou 0,5mM NADH + 0,05mM NAD. Fig. b - (●) controle; (△) 0,5mM NADH + 1mM 2-mercaptoetanol; (○) 0,5mM NADH ou 0,5mM NADH + 0,5mM NAD.

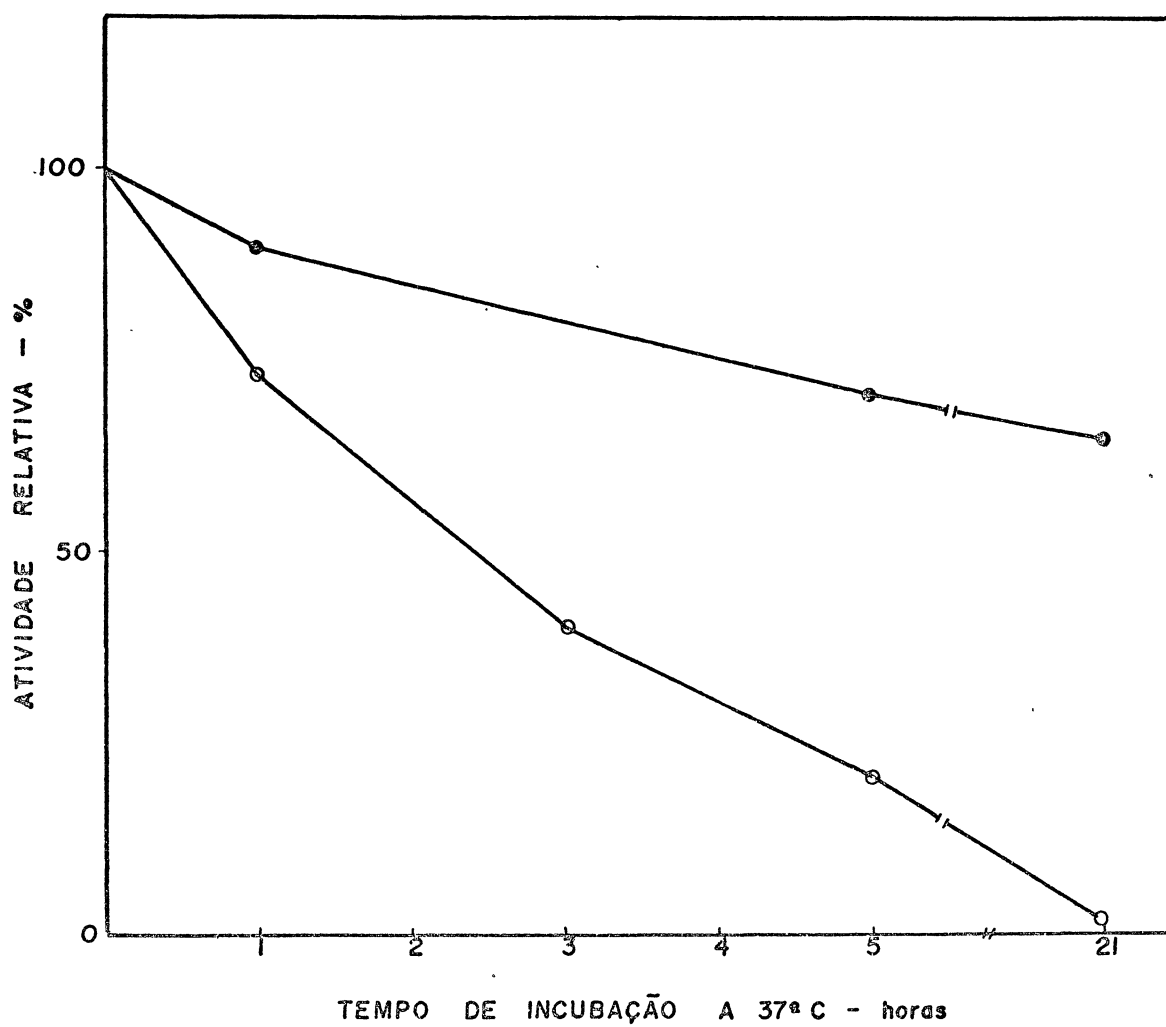


Fig. 18: Inativação da apoGPDH de músculo de *Caiman sp* por NADH.

Apoenzima na concentração $10 \mu\text{M}$ foi incubada a 37°C em presença de $0,5\text{mM}$ NADH por diferentes tempos e a seguir a atividade enzimática foi medida como descrito em *Materiais e Métodos*. (•) - controle; (◦) - $0,5 \text{ mM}$ NADH.

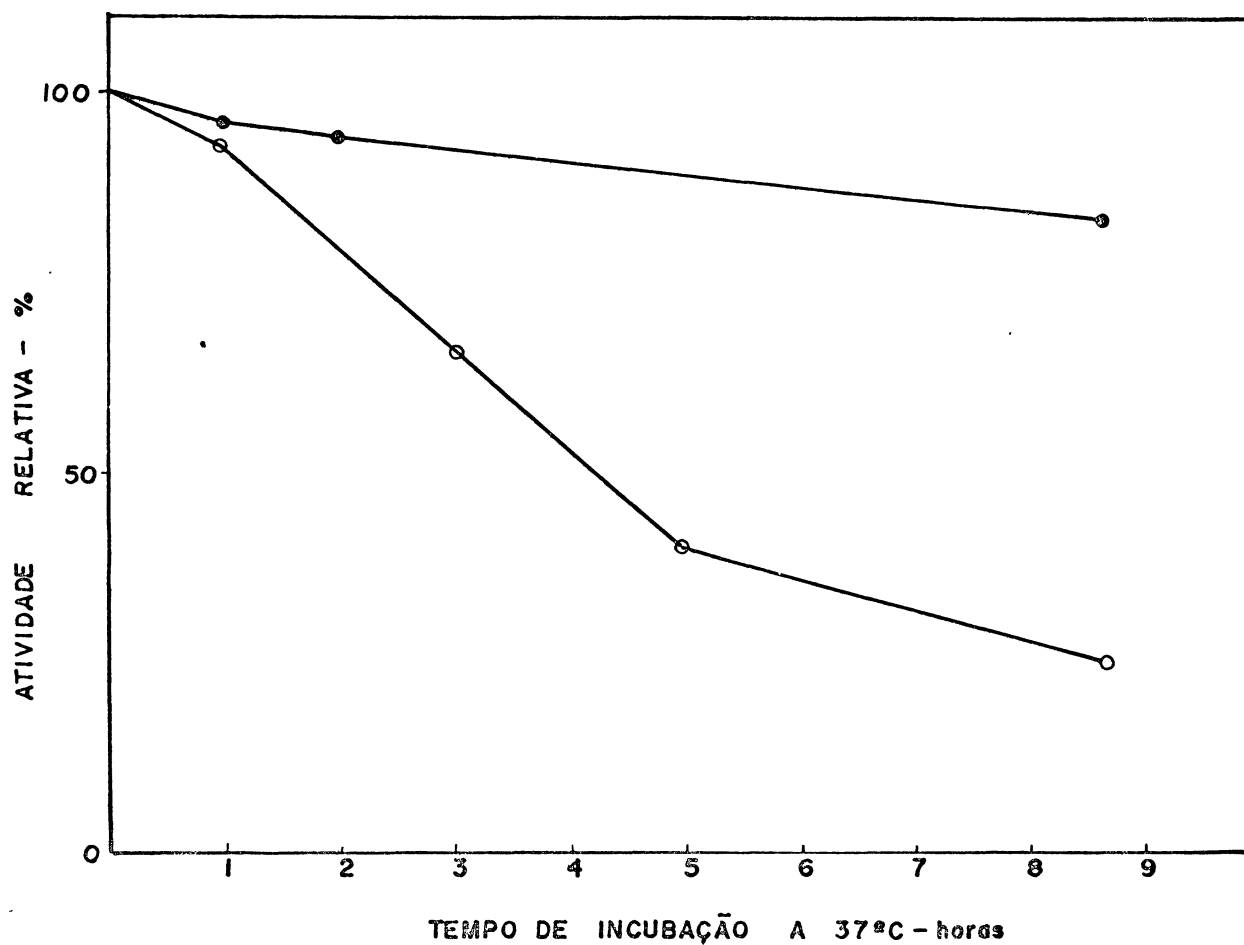


Fig. 19: Inativação da holoCPDH de músculo de *Caiman sp* por gliceraldeído-3-fosfato.

A enzima dialisada, na concentração 10 μ M foi incubada a 37°C em presença de G3P, na concentração 0,5mM. (•) controle ou 0,5mM NAD ou 0,5mM G3P + 1mM 2-mercaptoetanol; (◦) - 0,5mM G3P ou 0,5mM G3P + 0,5mM NAD.

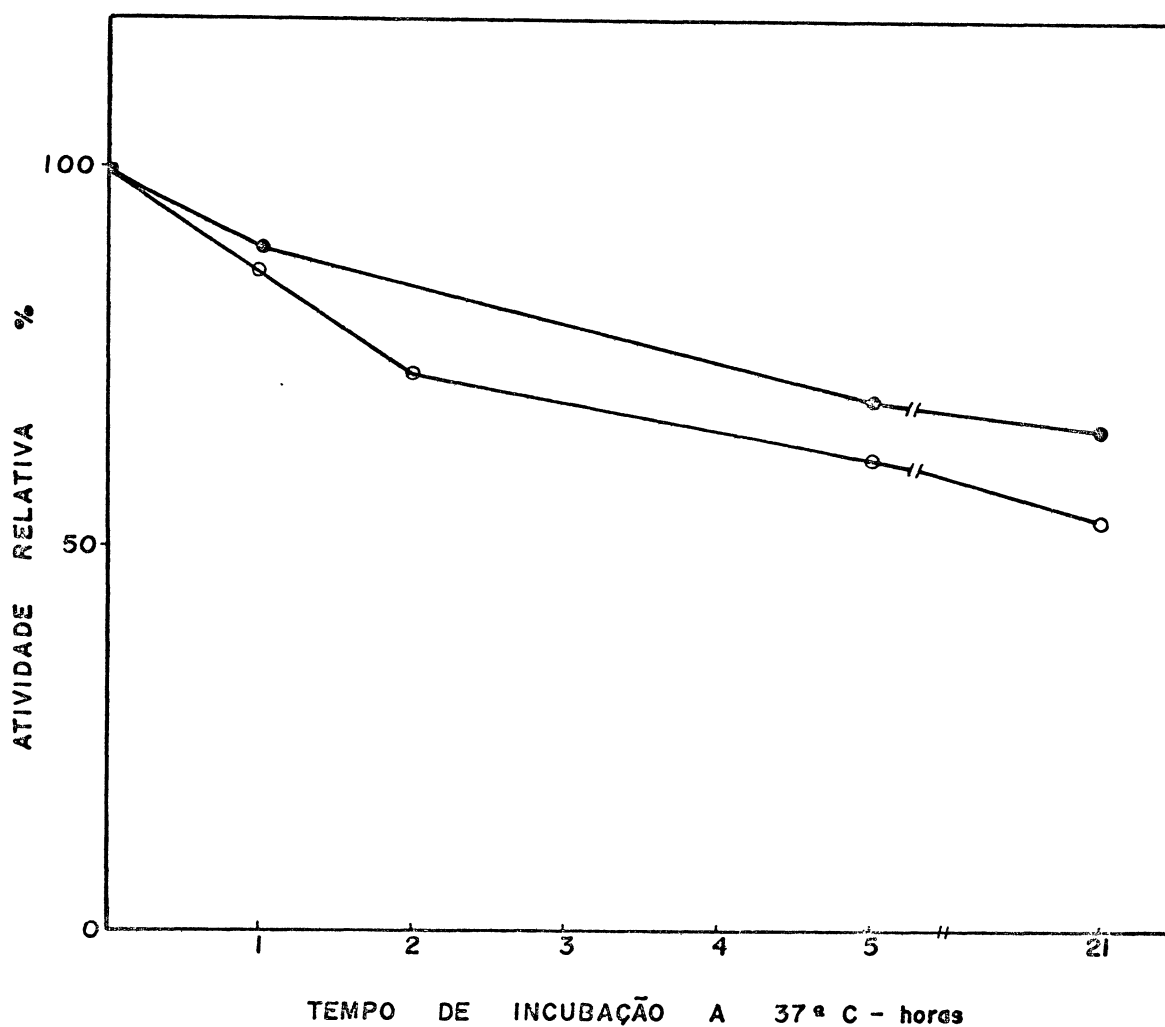


Fig. 20: Inativação da apoGPDH de músculo de *Caiman sp* por gliceraldeído-3-fosfato.

A apoenzima na concentração de $10 \mu\text{M}$ foi incubada a 37°C em presença de G3P por diferentes tempos e a seguir a atividade enzimática foi medida como descrito em *Materiais e Métodos*. (●) - controle; (○) - $0,5\text{mM}$ G3P.

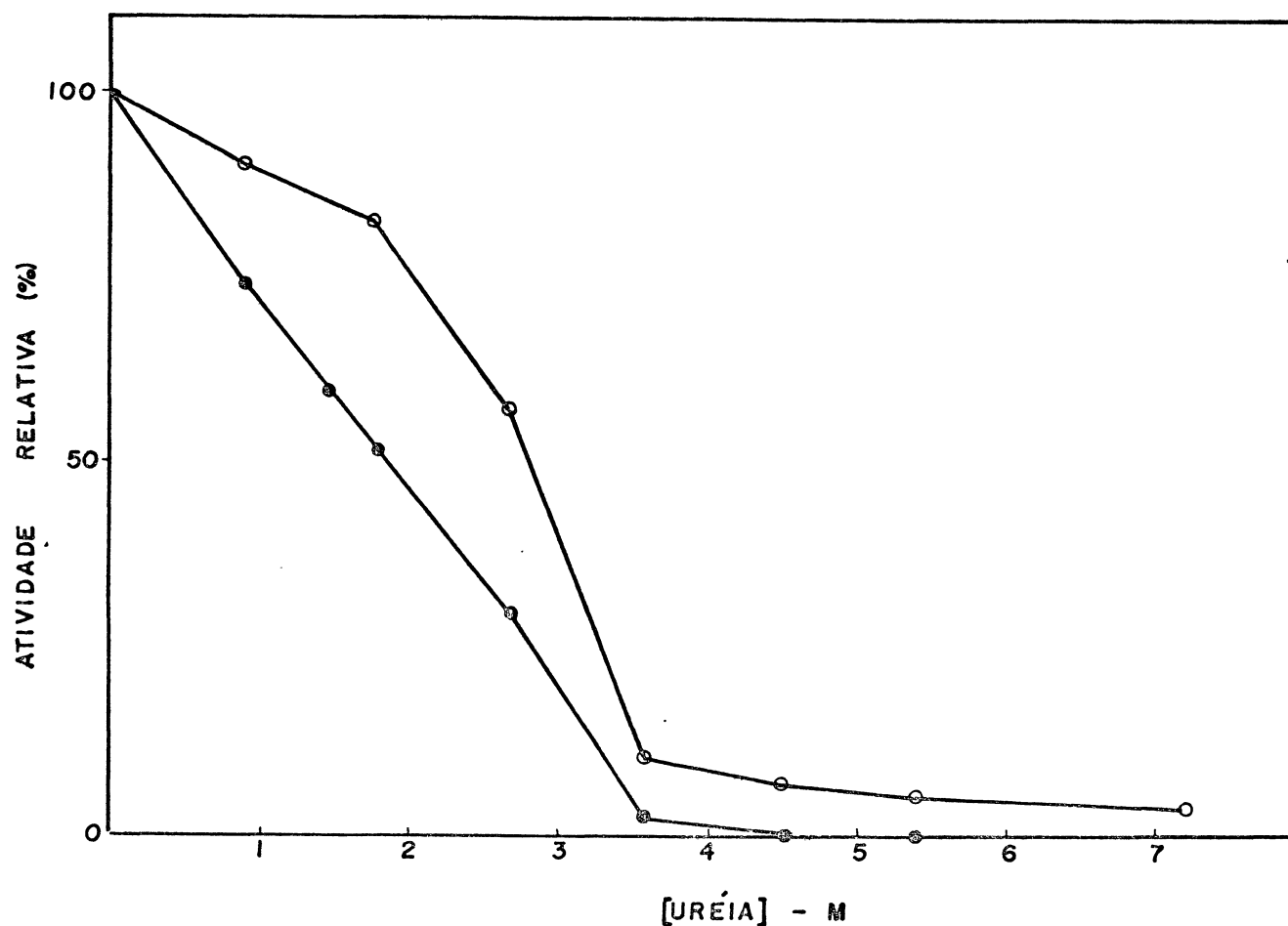


Fig. 21: Efeito da uréia na inativação da GPDH de músculo de *Caïman sp.*

A enzima foi centrifugada e o precipitado suspenso em tampão Imidazol-HCl 0,05M, pH 7,0 contendo EDTA 5mM e 2-mercaptoetanol 1mM. A solução de enzima foi diluída 10 vezes em um sistema tampão similar ao descrito acima, contendo diferentes concentrações de uréia e a seguir incubada por 60 minutos a 0°C.

A reassociação da enzima foi feita diluindo-se a mistura uréia-enzima, 100 vezes em tampão Imidazol-HCl 0,05M pH 7,0 contendo EDTA 5mM e 2-mercaptoetanol 1mM e incubando-se por 60 minutos a temperatura ambiente. (•) enzima inativada por uréia; (◦) enzima reativada.

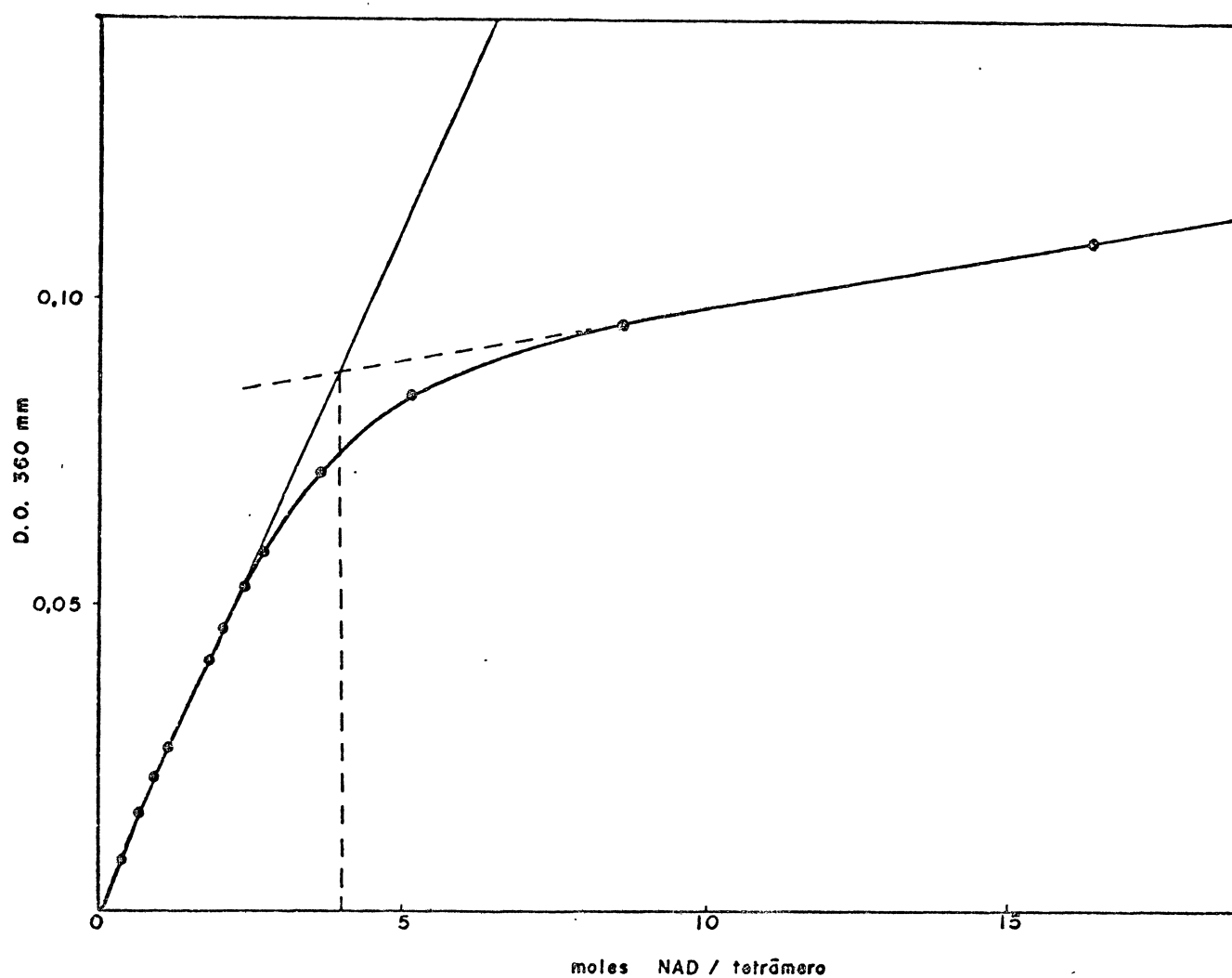


Fig. 22: Titulação da apoGPDH de músculo de *Caiman sp* pela *Banda de Racker*.

À ApoGPDH, na concentração 9,6 μM , suspensa em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 contendo EDTA 1mM foi acrescentado NAD em quantidades variáveis e a absorção à 360 nm relativa *Banda de Racker* foi medida.

4. DISCUSSÃO

A Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (D-gliceraldeído-3-fosfato: NAD, oxidoreductase) é uma enzima glicolítica que desempenha um papel chave tanto na glicólise como na gluconeogênese¹¹. Esta enzima tem sido isolada de várias origens, principalmente devido à facilidade de obtenção em forma homogênea, à reatividade dos grupos sulfidrílicos, à importância da reação como um protótipo para mecanismos de fosforilação oxidativa e as raras interações com o coenzima¹⁹³. Destes estudos concluiu-se que há uma grande similaridade estrutural entre as enzimas de diferentes origens, isto é, a estrutura da GPDH é em grande parte conservada no processo da evolução. As enzimas de diferentes mamíferos apresentam estruturas praticamente idênticas, havendo aproximadamente 70% de homologia na sequência de aminoácidos entre as enzimas de porco e de lagosta⁸⁵ e cerca de 68% de homologia entre as enzimas de levedura e mamífero⁹³.

É portanto bastante importante o isolamento e o estudo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de réptil, uma vez que nenhum trabalho foi feito neste sentido, a fim de

que esta enzima possa ser comparada em toda a escala filogenética. Neste trabalho, a enzima foi purificada até a homogeneidade e as propriedades da enzima foram estudadas, comparativamente às enzimas isoladas de outras fontes.

A GPDH de músculo de *Caïman sp* foi purificada por dois sucessivos fracionamentos com sulfato de amônio. A última etapa, que corresponde a uma saturação de 72% forneceu a enzima. É interessante notar, que todas as outras GPDHs homogêneas relatadas tem sido purificadas a partir de precipitados obtidos com uma saturação acima de 50% de sulfato de amônio, algumas acima de 70%. Esta observação sugere uma similaridade estrutural entre as várias gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases estudadas.

Tentativas para cristalizar a GPDH de *Caïman sp* não foram bem sucedidas, porém a enzima obtida como um precipitado amorfo em solução de sulfato de amônio, demonstrou ser homogênea por eletroforese em celogel, eletroforese em gel de poliacrilamida e eletroforese em gel de poliacritamida em presença de SDS.

Há dois grupos gerais de GPDHs que podem ser distinguidas em base do conteúdo de NAD da proteína isolada, um deles contém quantidades substanciais de NAD ligado e no qual se encontra a maioria das enzimas estudadas, o outro com pouco ou nenhum coenzima ligado que não pode ser removido por diálise ou cristalização, como é o caso das enzimas de levedura^{105,106}, esturjão, peru, faisão³ e *E.coli*⁴³.

A enzima de músculo de *Caiman sp* purificada apresenta NAD fortemente ligado, assemelhando-se à maioria das GPDHs estudadas. A razão $A_{280} : A_{260}$ obtida para a enzima purificada foi de 1,2, indicando um conteúdo de 3 moles NAD/mol de enzima. Como o coenzima está firmemente ligado, é difícil a obtenção da enzima livre. Após muitas tentativas conseguiu-se isolar a apoenzima, por tratamento com carvão ativo e filtração através de *Millipore*. A razão $A_{280} : A_{260}$ obtida para a apoenzima foi de 2,1, indicando estar a enzima totalmente livre de NAD. Este valor encontrado é bastante similar ao valor de 2,15 obtido por KIRSCHNER et al.⁹⁶ para a enzima de levedura e àquele de 2,2 obtido por MURDOCK & KOEPPE¹³¹ para a enzima de músculo de coelho. Valores um pouco mais baixos, 2,00 e 1,99 foram determinados por DE VIJLDER et al. para as enzimas de músculo de coelho⁴⁹ e de lagosta⁵¹. No caso da GPDH de músculo de coelho o NAD está mais firmemente ligado do que na enzima de levedura^{18, 196}. O coenzima assim ligado é extremamente difícil de ser removido, tanto na enzima de músculo de coelho¹⁸⁷, como na enzima de músculo de lagosta^{51, 187}. A remoção de todo o coenzima, destas enzimas, por prolongado tratamento com carvão ativo, resulta em uma apoenzima menos estável¹⁶⁴. A GPDH de *Euglena gracilis*⁷⁵ contém 4 moles de NAD ligado/mol de enzima; 3 moles do coenzima podem ser removidos por diálise exaustiva, sem perda da atividade. Por tratamento com carvão o nucleotídeo pode ser retirado totalmente, resultando

em uma completa perda da atividade enzimática. Resultados similares foram obtidos por SCHULMAN & GIBBS, para a enzima de ervilha¹⁶².

A GPDH de músculo de *Caiman sp* deve sempre ser conservada em presença de 2-mercaptoetanol, porque sem esta precaução a atividade específica da enzima purificada é baixa, somente 20 a 30% da atividade foi detectada na ausência do agente redutor. No caso da GPDH de levedura¹⁰⁶ a atividade máxima da enzima tem sido observada somente em presença de cisteína. Esta enzima recém-preparada apresenta-se 60 a 80% ativa sem cisteína porém o requerimento aumenta quando a enzima é guardada. Requerimento similar à GPDH de réptil é apresentado pela enzima de *Escherichia coli*⁴³ em que menos de 30% da atividade enzimática é observada na ausência de 2-mercaptoetanol no ensaio.

A GPDH de músculo de *Caiman sp*, purificada, apresenta propriedades enzimáticas similares às enzimas análogas, isoladas de outras fontes. Os valores de Km para G3P e NAD são comparáveis aos relatados para esta enzima isolada de uma grande variedade de fontes. Estudos de inibição revelam outras similaridades, havendo uma aparente inibição competitiva por nucleotídeos de adenina (ATP, ADP, AMP, AMP_C) com relação ao NAD.

O peso molecular de 140.000 determinado para a enzima de réptil é comparável àquele de 145.000 relatado por HARRINGTON & KARR⁸¹ para as enzimas de músculo de coelho e

porco, ao peso molecular de 145.000 para a enzima de lagosta⁴⁵, e para a enzima de *E. coli*⁴³, 144.000 para a enzima de membranas de eritrócito humano⁵⁵, de 148.000 para a enzima de *B. stearothermophilus*⁹ e de 140.000 para a enzima de *Euglena gracilis*⁷⁵.

A GPDH de músculo de réptil apresenta estrutura tetramérica e como todas as outras gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases estudadas é formada por subunidades idênticas ou quase idênticas⁸³.

Em relação à composição de amoníácidos da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, podemos observar pela Tabela II que as GPDHs de diferentes origens exibem uma composição de aminoácidos bastante similar.

O ponto isoelétrico da GPDH de músculo de *Caiman sp* foi estimado ser de 8,9, através de experimentos de focalização isoelétrica. Este valor é semelhante aqueles obtidos para as várias enzimas de músculo³, mas é diferente daqueles obtidos para as enzimas de bactérias¹⁷⁴ que são relativamente mais ácidas (pI-5,0).

O pH ótimo da GPDH de músculo de *Caiman sp* é de 8,0. Este valor de pH se encontra na faixa geral de valores de pH ótimo relatada para a maioria das GPDHs^{158,193}. O decréscimo na atividade enzimática em valores de pH mais altos, não é tão agudo como aquele descrito por BONDI²⁰ para GPDH de tecidos de coelho.

O envolvimento de grupos tiólicos na atividade da

GPDH foi indicado já nos primeiros estudos sobre esta enzima, pela sensibilidade à inibição por iodoacetato e metais pesados¹⁵². Foi portanto assumido freqüentemente que a reativação da enzima, inativada espontaneamente, por cisteína era devido à redução de grupos tiólicos oxidados.

DAVIDSON et al.⁴⁵ demonstraram que a inibição da GPDH por agente oxidante, como o ácido iodosobenzóico, é devido à formação de uma ligação dissulfeto intramolecular no centro ativo. Outros reagentes inibem a GPDH pela formação de mercaptídeos. No caso do p-mercuribenzoato, 2 equivalentes inibem completamente a atividade da enzima de levedura, que pode ser reativada completamente, pela adição de cisteína¹⁹². BATKE et al.¹² estudando a reação da cisteína-149 da GPDH de músculo de porco com p-hidroximercuribenzoato, demonstrou que a enzima reage com p-hidroximercuribenzoato, formando em complexo ternário. Uma cinética de 1^a ordem bifásica foi demonstrada para a formação do mercaptídeo e liberação do NAD, o que indica que há diferenças na reatividade dos resíduos Cys-149 e entre os sítios de ligação do NAD dentro do tetrâmero.

Para a GPDH de músculo de *Caiman sp*, observou-se que a inibição pela formação de mercaptídeos, em presença de ácido p-cloromercuribenzóico e p-hidroximercuribenzoato foi de aproximadamente 90% e 100% respectivamente, sendo esta inibição revertida por excesso de 2-mercaptoetanol.

A inibição de músculo de réptil, por agentes oxidan-

tes, como 2-cloro-4-aminobenzoato e ácido ortoiodosobenzóico foi apenas parcial e também revertida por 2-mercaptoetanol.

A GPDH de músculo de *Caiman sp* é inibida cerca de 67,5%, quando tratada por iodoacetamida (0,1mM), neste caso o mecanismo de inibição é por alquilação e portanto irreversível.

STANCEL & DEAL^{180,181} descreveram que a GPDH de levedura, em concentrações moderadamente baixas de proteína, perde a atividade lentamente, quando exposta a ATP, a 0°C. CONSTANTINIDES & DEAL³⁵ encontraram para a GPDH de músculo de coelho, uma inativação similar, porém mais rápida. Para a enzima de fígado de porco, DACHER & DEAL⁴¹ descreveram uma lenta perda da atividade em função do tempo, nas mesmas condições.

Foi demonstrado que as GPDHs de músculo de coelho³⁵, levedura¹⁸¹ e fígado de porco⁴¹ sofrem dissociação, provavelmente em monômeros, quando incubadas em presença de ATP, a 0°C. A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Dissostichus mawsoni*, um peixe da antártida adaptado ao frio, é muito menos sensível à inativação por ATP, a 0°C⁷⁴ quando comparada à enzima de coelho. Esta propriedade de resistência à inativação por ATP é provavelmente vantajosa para a adaptação do peixe ao frio. Uma resistência similar tem sido descrita por GELB & NORDIN*, citado por GREENE & FEENEY⁷⁴,

*GELB, W. & NORDIN, J.H. Abstr. Federation Amer. Soc. Exptl. Biol. n° 2362, 1970.

para a GPDH de abelhas que são expostas a baixas temperaturas durante a hibernação.

A GPDH de músculo de *Caiman sp* demonstrou uma rápida perda de atividade em presença de ATP, a 0°C. Uma incubação por 1 hora a 0°C, em presença de ATP, na concentração 10mM, causou uma perda de 80% da atividade original. Portanto, sob este aspecto a enzima de réptil é similar à enzima de músculo de coelho³⁵. Incubação, da enzima inativada, por 30 minutos à temperatura ambiente resultou em uma parcial recuperação da atividade.

CHILSON et al.³¹ descreveram a inativação reversível de várias desidrogenases, quando submetidas a tratamento com uréia, guanidina ou ácidos. GPDH isolada de galinha, faisão, ostra, lagosta, coelho, esturjão, hipoglosso e levedura foram estudadas sob este aspecto. Estas enzimas inativadas por uréia 8M, foram sujeitas a reassociação em presença de 2-mercaptoetanol 100 mM. Com exceção das enzimas de levedura e hipoglosso, 35 a 85% da atividade enzimática foi recuperada. A observação da formação de híbrido entre GPDH de lagosta e hipoglosso, dá forte evidência de que GPDH desnaturada por uréia encontra-se dissociada em subunidades³¹.

Um estudo sistemático das variáveis que afetam a reassociação, *in vitro*, da GPDH de levedura, à partir de subunidades dissociadas por uréia, foi realizado por DEAL⁴⁷. A reassociação da enzima de levedura, como foi demonstrado, requer a presença do cofator NAD, o que explica a falta de

êxito dos pesquisadores anteriores, em obter a reversão da dissociação desta enzima. É importante ressaltar que a GPDH de levedura purificada, está isenta de NAD^+ ligado. Este requerimento *in vitro* de NAD^+ para o processo de dobramento da GPDH de levedura, enfatiza que a seqüência de aminoácidos somente, pode não ser adequada para proporcionar o dobramento correto dos polipeptídeos nascentes ou completados, *in vivo*, e que nicotinamidaadenina dinucleotídeo pode realizar esta função e portanto controlar a velocidade de síntese da enzima⁴⁷.

A enzima de *Caiman sp* perde cerca de 50% da atividade em presença de uréia na concentração 2M. Para a enzima de coelho, uma perda de 50% da atividade é obtida em uréia 5M⁶⁴. Entretanto para a enzima de *Thermus thermophilus*⁶⁴, somente 40% de inativação ocorre em presença de uréia 8M. Portanto comparativamente a estas enzimas, a enzima de réptil é muito menos resistente à inativação por uréia.

Diferente da enzima de levedura⁴⁷ e de músculo⁴⁸, que sofrem reassociação espontânea quando dissociada por uréia, a enzima de músculo de *Caiman sp* não recupera significativamente sua atividade original depois de uma diluição de cem vezes e aquecimento subsequente, à temperatura ambiente. Nas condições descritas e também na presença de 2-mercaptoetanol, em concentração mais alta (100 mM) e NAD (27 mM), os resultados não sofreram modificações. Pequena recuperação da atividade enzimática, foi obtida quando a enzima

foi inativada em presença de uréia, em baixas concentrações, isto é, se a enzima não estava totalmente desnaturada, conseguia-se uma recuperação parcial da atividade. Comportamento bastante similar a este, foi observado para GPDH de fígado de porco⁴¹. Neste caso a presença de NAD^+ 5mM tem um efeito protetor contra a inativação enzimática por uréia, mas não aumenta significativamente a renaturação.

Estudos têm demonstrado^{18,90,92,153,190} que as enzimas podem se tornar menos estáveis a agentes físicos na presença de substratos e cofatores, e que variações na concentração e combinação dos componentes necessários, afetam profundamente a estabilidade enzimática. O fato bastante comum^{18,90,92,153,190} do aumento da instabilidade de enzimas na presença de substratos e cofatores sob condições *in vitro*, sugere que o fenômeno poderia ter importância em biologia¹⁹⁰. É portanto, muito importante se verificar se este fenômeno ocorre sob condições fisiológicas.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é muito susceptível à inativação em presença de NAD reduzido. TUCKER & GRISÓLIA¹⁹¹ estudaram a inativação da triose fosfato desidrogenase de músculo, por seu cofator, NADH, em concentrações fisiológicas e concluíram que nas amostras extensivamente inativadas ocorre uma perda de 50% dos grupos sulfidrílicos tituláveis. Segundo AMELUNXEN & GRISÓLIA⁵ a inativação da triose fosfato desidrogenase por NADH ocorre em etapas: a - substituição do NAD^+ ligado à enzima por NADH;

b - exposição dos grupos-SH à oxidação por oxigênio molecular, resultando na formação de água oxigenada (H_2O_2); c - destruição da atividade enzimática por H_2O_2 .

Em 1965, CARR et al.²⁹ observaram que quando a GPDH é incubada em presença de NADH ou NADH e gliceraldeído-3-fosfato, as características de ligação do coenzima são alteradas. Extensas modificações ocorrem somente em presença de oxigênio e paralelamente há perda da atividade enzimática. Experimentos têm demonstrado²⁹ que se a enzima é incubada na presença de NADH, posteriormente nenhum NADH é liberado da enzima, como julgado pela falta de mudança na fluorescência. Os dados de titulação sugerem que a mistura continha duas espécies de enzima: a enzima que continuava ativa e não tinha NADH ligado e a proteína inativa com 2 moles de NADH ligado por mol de proteína²⁹.

Segundo AMELUNXEN & GRISOLIA⁵ quando a GPDH era incubada em presença de NADH em condições de anaerobiose não ocorria inativação ou quando G3P estava presente na mistura de incubação, não era observado ligação de NADH; com G3P presente havia cerca de 30% de inativação da enzima; entretanto não ocorria perda de grupos-SH²⁸. Isto sugere que o mecanismo de inativação por G3P não é o mesmo que o mecanismo induzido por NADH ou NADH-G3P. Os dados tem demonstrado⁶ que a enzima é inativada por G3P quando incubada sob condições anaeróbicas ou aeróbicas, porém não ocorrendo perda dos grupos-SH.

A inativação da GPDH por NADH, como já descrito é acompanhada de perda de grupos-SH tituláveis^{5,6,191} entretanto, esta inativação pode ser impedida, se na mistura de incubação for adicionado ditioeritritol ou cisteína⁷. Se a enzima está cerca de 50% inativada, a atividade pode ser recuperada em 75% por incubação da enzima por 7 minutos com ditioeritritol ou cisteína; entretanto se a enzima se encontrar extensivamente inativada (2 h em presença de NADH), a atividade enzimática não é recuperada pela adição de mercaptanas⁷.

Em 1979, KREBS et al.¹⁰⁷ estudando a influência do coenzima no dobramento e reassociação *in vitro* da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de levedura, observaram que a enzima é estabilizada por NAD^+ , porém na presença de NADH, ocorre desestabilização e perda da estrutura quaternária. Eles sugerem que mudanças conformacionais na GPDH que ocorrem quando coenzima ou íons se ligam à enzima, podem alterar a suscetibilidade de grupos reativos funcionais em relação à modificação química. Neste caso a proteção de grupos sulfidrílicos por ditioeritritol e exclusão de oxigênio estabilizariam a enzima nativa.

AMELUNXEN⁸ comparando a inativação por NADH da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Bacillus stearothermophilus* e de músculo de coelho observou que a enzima de bactéria é extensivamente inativada pelo coenzima reduzido, porém é necessário uma incubação a 60° para se obter uma

inativação tão extensa quanto a da enzima de músculo, a 37°C.

Para a GPDH de músculo de *Caiman sp*, verificou-se que semelhantemente às outras enzimas descritas anteriormente, ela é extensivamente inativada por NADH. Nestes experimentos a concentração do coenzima reduzido foi mantida entre 0,1 e 0,5mM, que são os limites fisiológicos para este coenzima⁷⁰. A inativação da enzima de réptil por NADH pode ser impedida, se adicionarmos 2-mercaptoetanol à mistura de incubação. Uma amostra 80% inativada, em condições aeróbicas teve uma redução de 40% dos grupos-SH tituláveis.

Uma possível relação entre a inativação por NADH e a presença de metais pesados foi estudada^{7,191}. Os metais pesados presentes na solução tampão não estariam envolvidos desde que são sujeitos a controle, mas a possibilidade de que NADH contivesse metais pesados não pode ser excluída. Constatou-se que para a enzima de músculo de coelho, a adição de agentes complexantes tais como: KCN, KSCN, EDTA, etc., não tem qualquer efeito na inativação enzimática induzida por NADH. Resultados semelhantes foram encontrados para a GPDH de réptil em que a presença de EDTA não modificou de maneira significativa a inativação induzida pelo coenzima reduzido.

Estudos com relação à estabilidade a 37° da apo e holoGPDH de *Caiman sp*, na ausência e na presença de NADH ou G3P, demonstraram que ambas se comportam de maneira seme-

lhante quanto à inativação por NADH, o que é bastante raro uma vez que, para a maioria das GPDHs estudadas, a apoenzima é mais instável que a respectiva holoenzima, como é o caso da GPDH de músculo de coelho¹⁹¹ em que, pela remoção do NAD ligado à enzima, a estabilidade enzimática decresce, com ou sem adição de NADH. Quanto à inativação por G3P, constatou-se que a apoenzima de réptil aparentemente é mais estável que a holoenzima, obtendo-se 60% de inativação para a holoenzima e cerca de 40% de inativação para a apoenzima em presença de G3P, na concentração 0,5 mM, após 5 horas de incubação.

Embora muitos estudos tenham sido realizados em relação a este tipo de inativação, a questão do significado fisiológico deste processo permanece ainda em aberto³⁴.

Estudos quantitativos tem sido realizados, em relação à quantidade de NAD^+ ligado à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Os métodos incluem a remoção do coenzima por tratamento com carvão ativado e a determinação quantitativa da recombinação do coenzima com a enzima a 360 nm.

A enzima isolada de músculo de coelho⁵¹ contém 3,6 - 3,7 moles de NAD^+ /mol de enzima. CONWAY & KOSHLAND³⁶ demonstraram que a ligação da 4^a molécula de NAD^+ à enzima de coelho não tem qualquer efeito sobre a viscosidade, indicando pouco ou mesmo nenhum efeito sobre a conformação da proteína. Foi observado que as duas primeiras moléculas de NAD^+ são ligadas muito fortemente à enzima, a terceira menos for-

temente e a quarta mais fracamente^{18,36,49}. Segundo CONWAY & KOSHLAND³⁶ a ligação de NAD^+ à enzima de músculo de coelho ocorre com *cooperatividade negativa*.

A enzima de levedura, ao contrário da enzima de coelho, quando isolada contém somente traços de NAD^+ ¹⁰⁵; estudos têm demonstrado que a ligação de NAD^+ à enzima ocorre com *cooperatividade positiva*^{96,97}.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de lagosta é mais semelhante à enzima de músculo de coelho do que de levedura. Quando isolada, a enzima apresenta 3,9 moles de NAD /mol de enzima⁵¹. DE VIJLDER et al.⁵¹ demonstraram por diálise de equilíbrio e ultrafiltração que 4 moles de NAD^+ podem ser ligados por mol de enzima e que as três primeiras moléculas contribuem igualmente para a absorção a 360 nm e a quarta faz pouca ou nenhuma contribuição.

SEYDOUX et al.¹⁶⁴ demonstraram para GPDH de esturjão que a ligação do NAD^+ ocorre em quatro sítios por tetrâmero, porém a afinidade pelo ligante é heterogênea, ocorrendo com *cooperatividade negativa*.

ALLEN & HARRIS² observaram uma leve cooperatividade negativa na ligação da terceira e quarta moléculas de coenzima para GPDH de *Bacillus stearothermophilus*.

Estudos relativos à fixação de NAD^+ pela enzima de *Caiman sp* demonstraram que quatro moles de NAD^+ podem ser ligados por mol de enzima. Somente estes estudos, entretanto, não nos permitem afirmar se a ligação do coenzima pela

apoGPDH de músculo de *Caiman sp* ocorre com cooperatividade negativa, como é o caso das enzimas de músculo de coelho^{36, 49}, de músculo de lagosta⁵¹, de esturjão¹⁶⁴ ou de *B. stercorarius*². O fato desta enzima quando isolada apresentar 3 moles de NAD^+ ligado por mol de enzima, sugere que a 4^a molécula deve estar ligada mais fracamente e portanto foi perdida no processo de isolamento da enzima, indicando a possibilidade de um mecanismo de cooperatividade negativa.

Embora exista grande similaridade entre as gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases estudadas quanto à função, o que é comprovado pelas propriedades comuns apresentadas, como pela análise da composição de aminoácidos, que é praticamente idêntica, mesmo para organismos distantes filogenicamente; podemos dizer que a enzima de réptil se assemelha mais às enzimas de outros vertebrados que às enzimas de invertebrados, bactérias ou plantas.

Estes vários dados, referentes às propriedades das muitas GPDHs purificadas, juntamente com os dados de sequência de aminoácidos das enzimas de bactérias¹⁵, levedura⁹³, músculo de lagosta⁴⁵ e músculo de porco⁸⁵, sugerem ser a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase uma enzima de evolução lenta e portanto de grande utilidade para estudos filogenéticos de alto nível.

5. CONCLUSÕES

- 1 - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi isolada de músculo de *Caiman sp* e purificada através de precipitação fracionada com sulfato de amônio. O rendimento obtido, com este método, foi de 16% com uma purificação de 57 vezes.
- 2 - A GPDH purificada, obtida como um precipitado amorfo em solução de sulfato de amônio, foi considerada homogênea, como demonstrado por eletroforese em celogel, eletroforese em gel de poliacrilamida, eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.
- 3 - A enzima purificada apresenta NAD^+ fortemente ligado. A razão $A_{280} : A_{260}$ obtida para a enzima purificada foi de 1,2, indicando um conteúdo de 3 moles de NAD por mol de enzima.
- 4 - O coeficiente de extinção determinado para a holoenzima de $A_{280}^{0,1\%} = 0,9$ e para a apoenzima foi de 1,0.
- 5 - O peso molecular da enzima nativa foi estimado em apro-

ximadamente 140.000 daltons, por filtração em gel sephadex G-150. O peso molecular da subunidade determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS foi de 36.000 daltons. A enzima nativa é portanto um tetrâmero contendo subunidades de igual tamanho.

- 6 - O pH ótimo da enzima foi demonstrado ser de 8,0 em tampão Tris-HCl.
- 7 - A GPDH de músculo de *Caiman sp* apresenta um ponto isoeletrico de 8,9 como demonstrado por experimentos de focalização isoeletrica.
- 8 - A GPDH de músculo de *Caiman sp* é ativada por 2-mercaptoetanol e ditioeritritol. A ativação máxima da enzima foi obtida com os agentes redutores na concentração 10 mM.
- 9 - A GPDH é ativada por arseniato, sendo 50 mM a concentração ótima para ativação.
- 10 - A pH 8,0 e a 25°C os valores de Km para gliceraldeído-3-fosfato e NAD foram de 70 μ M e 15 μ M, respectivamente. Em ambos os casos o efeito do aumento da concentração do substrato demonstrou uma cinética hiperbólica.
- 11 - NADH e outros nucleotídeos de adenina (ATP, ADP, AMP, AMP_C) inibem competitivamente a enzima. Os valores de Ki, a pH 8,0 e a 25°C foram: Ki NADH = 38 μ M, Ki ATP =

6,1 mM, $K_{i_{ADP}} = 1,5$ mM, $K_{i_{AMP}} = 1,3$ mM e $K_{i_{AMP_C}} = 0,5$ mM.

- 12 - Os íons Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} não afetam significativamente a atividade enzimática. Os íons Hg^{++} , Cu^{++} e Zn^{++} inibem totalmente a atividade enzimática. A inibição por Hg^{++} e Cu^{++} provavelmente é devida a oxidação dos grupos sulfidrílicos do sítio ativo. A inibição por Zn^{++} não foi esclarecida.
- 13 - A atividade da GPDH de músculo de *Caíman sp* é inibida por mercuriais. Dentre os reagentes testados o p-hidroximercuribenzoato foi o inibidor mais potente, inibindo 100% da atividade enzimática, na concentração 0,1 mM. A inibição pelos mercuriais testados foi revertida pela adição de um excesso de 2-mercaptoetanol, com exceção da inibição por iodoacetamida que foi demonstrada ser irreversível.
- 14 - A GPDH é inativada quando incubada com ATP a 0°C. Esta inativação é parcialmente revertida quando a enzima inativada é incubada à temperatura ambiente.
- 15 - A GPDH é inativada quando incubada em presença de uréia, a 0°C. Foi demonstrado que concentrações de uréia superiores a 4M inativam totalmente a enzima. A atividade enzimática não é recuperada em quantidades apreciáveis quando a enzima é diluída cem vezes, para reduzir a con-

centração de uréia, e incubada à temperatura ambiente.

- 16 - A GPDH é inativada quando incubada em presença de NADH, a 37°C. A holoenzima é 80% inativada quando incubada em presença de NADH, 0,5 mM, por 5 horas, a 37°C. NAD^+ não tem efeito protetor em relação a esta inativação, mas a presença de 2-mercaptoetanol 1 mM protege a enzima da inativação pelo coenzima reduzido. A apoenzima, semelhante à holoenzima, foi também 80% inativada, nas mesmas condições. A titulação dos grupos-SH das enzimas inativadas por NADH, mostrou perda de aproximadamente 40% dos grupos-SH, em relação ao controle, também incubado a 37°C, porém na ausência do coenzima reduzido.
- 17 - A GPDH é inativada quando incubada em presença de gliceraldeído-3-fosfato a 37°C. Aparentemente a apoenzima é mais estável que a holoenzima quanto a este tipo de inativação. Após 5 horas de incubação a 37°C, em presença G3P 0,5 mM houve aproximadamente 60% de inativação para a holoenzima e 40% de inativação para a apoenzima.
- 18 - Através de estudos de fixação do coenzima- NAD^+ pela apoenzima de músculo de *Caiman sp* pela titulação da Banda de Racker a 360 nm foi demonstrado que 4 moles de NAD^+ podem ser ligados por mol de enzima.
- 19 - A GPDH de músculo de *Caiman sp* tem aproximadamente 13,8

grupos-SH por mol de enzima. Dentre eles aproximadamente 4 grupos são mais reativos, correspondendo aos grupos sulfidrílicos do sítio ativo da enzima.

- 20 - Quanto a composição de aminoácidos da GPDH de músculo de *Caiman sp* os resultados obtidos demonstram grande similaridade entre esta enzima e as enzimas isoladas de outras fontes.
- 21 - Comparando os resultados dos estudos realizados com a enzima de réptil em relação às demais enzimas estudadas, conclui-se que a mesma se assemelha mais às enzimas de músculo de mamíferos do que às enzimas de bactérias, levedura ou vegetais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, M.J.; McPHERSON, Jr., A.; ROSSMANN, M.G.; SCHEVITZ, R.W.; WONACOTT, A.J. The structure of the nicotinamide-adenine dinucleotide coenzyme when bound to lactate dehydrogenase. J.Mol.Biol., 51:31-38, 1970.
2. ALLEN, G. & HARRIS, J.I. The binding of nicotinamide adenine dinucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Biochem. J., 151:747-749, 1975.
3. ALLISON, W.S. & KAPLAN, N.O. The comparative enzymology of triosephosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 239: 2140-2152, 1964.
4. _____. Effect of tetrathionate on the stability and immunological properties of muscle triosephosphate dehydrogenase. Biochemistry, 3:1792-1800, 1964.
5. AMELUNXEN, R.E. & GRISOLIA, S. The mechanism of triosephosphate dehydrogenase inactivation by reduced diphosphopyridine nucleotide. J.Biol.Chem., 237:3240-3244, 1962.
6. AMELUNXEN, R.E.; CARR, D.O.; GRISOLIA, S. Influence of substrate-induced enzymic inactivation on the sul-

thiyl content of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta, 113:184-186, 1966.

7. AMELUNXEN, R.E. & CARR, D.O. The crystallization and properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isolated from rabbit muscle by a simplified procedure. Biochim.Biophys.Acta, 132:256-259, 1967.
8. AMELUNXEN, R.E. Some chemical and physical properties of thermostable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Biochim.Biophys.Acta, 139:24-32, 1967.
9. AMELUNXEN, R.E.; NOELKEN, M.; SINGLETON Jr., R. Studies on the subunit structure of thermostable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Arch.Biochem.Biophys., 141:447-455, 1970.
10. ANDREWS, P. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem.J., 96:595-606, 1965.
11. BANÁS, T.; BANÁS, B.; WOLNY, M. Kinetic studies of the reactivity of the sulfhydryl groups of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Eur.J.Biochem., 68:313-319, 1976.
12. BATKE, J.; KELETI, T.; FISCHER, E. The mechanism of reaction of Cys-149 of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with p-hydroxy-mercuribenzoate. Eur.J.Biochem., 46:307-315, 1974.
13. BERNHARD, S.A. & MACQUARRIE, R.A. Half-site reactivity and the *induced fit* hypothesis. J.Mol.Biol., 74:73-78, 1973.

14. BERNI, R.; MOZZARELLI, A.; ROSSI, G.L.; BOLOGNESI, M.; OBERTI, R. Crystallographic symmetry and coenzyme binding properties of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the tail of *Palinurus vulgaris*. J. Biol.Chem., 254:8004-8006, 1979.
15. BIESECKER, G.; HARRIS, J.I.; THIERRY, J.C.; WALKER, J. E. Sequence and structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Nature (Lond), 266:328-333, 1977.
16. BLOCH, W.; MACQUARRIE, R.A.; BERNHARD, S.A. The nucleotide and acyl groups content of native rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., 246:780-790, 1971.
17. BODE, J.; BLUMENSTEIN, M.; RAFTERY, M.A. ^{19}F nuclear magnetic resonance studies of structure and function relationships in trifluoroacetylated rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 14:1153-1160, 1975.
18. BOERS, W.; OOSTHUIZEN, C.; SLATER, E.C. Binding of NAD and NADH to rabbit muscle glyceraldehydophosphate dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta, 250:35-46, 1971.
19. BOND, J.S.; FRANCIS, S.H.; PARK, J.H. An essential histididine in the catalytic activities of 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase. J.Biol.Chem., 245:1041-1053, 1970.
20. BONDI, E.; WATKINS, J.; KIRTLEY, M.E. Comparison of the activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rabbit tissues. Biochim.Biophys.Acta, 185:305-309, 1969.

21. BRÄNDEN, C.I.; JÖRNVALL, H.; EKLUND, H.; FURUGREN, B. Alcohol dehydrogenases. In: BOYER, P.D. ed. Oxidation-Reduction; Dehydrogenases, electron transfer. 3 ed. New York, Academic, 1975. p.103-190. (The Enzymes, XI).
22. BUEHNER, M.; FORD, G.C.; MORAS, D.; OLSEN, K.W.; ROSS-MANN, M.G. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: three-dimensional structure and evolutionary significance. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 70:3052-3054, 1973.
23. _____. Structure determination of crystalline lobster D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Mol.Biol., 82:563-585, 1974.
24. _____. Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Mol.Biol., 90:25-49, 1974.
25. CAPUTTO, R. & DIXON, M. Crystallization and identity of the Triose and Triosephosphate dehydrogenase of muscle. Nature (Lond), 156:630-631, 1945.
26. CARDON, J.W. & BOYER, P.D. Subunit interaction in catalysis. Some experimental and theoretical approaches with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 257:7615-7622, 1982.
27. CARLSON, C.W. & BROSEMER, R.W. Comparative structural properties of insect triose phosphate dehydrogenases. Biochemistry, 10:2113-2119, 1971.
28. CARR, D.; AMELUNXEN, R.; CURRAN, G.; GRISOLIA, S. Mechanism of DPNH induced decrease in stability of triosephosphate dehydrogenase. Fed.Proc., 23:277, 1964.

29. CARR, D.O.; AMELUNXEN, R.; GRISOLIA, S. Coenzyme binding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase after modification by substrate and coenzyme. Biochim. Biophys. Acta, 110:507-512, 1965.
30. CATÁLOGO do LKB, nº 8.100. Preparative electrofocusing.
31. CHILSON, O.P.; KITTO, G.B.; PUDLES, J.; KAPLAN, O. Reversible inactivation of dehydrogenases. J. Biol. Chem., 241:2431-2445, 1966.
32. CILENTO, G. & GIUSTI, P. Electron transfer from the indole nucleus to the pyridine coenzymes. J. Am. Chem. Soc., 81:3801-3802, 1959.
33. CILENTO, G. & TEDESCHI, P. Pyridine coenzymes. IV. Charge transfer interaction with the indole nucleus. J. Biol. Chem., 236:907-910, 1961.
34. COLOWICK, S.P.; VAN EYES, J.; PARK, J.H. Dehydrogenation. 8. Mechanism of action of 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase. In: FLORKIN, M. & STOTZ, E.H. ed. Biological oxidations. Amsterdam, Elsevier, 1966. p. 63-98 (Comprehensive Biochemistry, v.14).
35. CONSTANTINIDES, S.M. & DEAL Jr., W.C. Reversible dissociation of tetrameric rabbit muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase into dimers or monomers by ATP. J. Biol. Chem., 244:5695-5702, 1969.
36. CONWAY, A. & KOSHLAND Jr., D.E. Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 7:4011-4022, 1968.

37. COOK, R.A. & KOSHLAND Jr., D.E. Positive and negative cooperativity in yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 9:3337-3342, 1970.
38. CORI, G.T.; SLEIN, M.W.; CORI, C.F. Isolation and crystallization of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. J.Biol.Chem., 159:565-566, 1945.
39. _____. Crystalline D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. J.Biol.Chem., 173:605-618, 1948.
40. CRABB, J.W.; MURDOCK, A.L.; AMELUNXEN, R.E. Purification and characterization of thermolabile glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the facultative thermophile *Bacillus coagulans* KU. Biochemistry, 16:4840-4847, 1977.
41. DAGHER, S.M. & DEAL Jr., W.C. Pig liver glyceraldehyde-3-P dehydrogenase: Purification, crystallization and characterization. Arch.Biochem.Biophys., 179:643-653, 1977.
42. D'ALESSIO, G. & JOSSE, J. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and phosphoglyceromutase of *Escherichia coli*. J.Biol.Chem., 246:4319-4325, 1971.
43. _____. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Structural and catalytic properties. J. Biol. Chem., 246:4326-4333, 1971.
44. DARNALL, D.W. & BARELA, T.D. β -structure in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta, 236:593-598, 1971.

45. DAVIDSON, B.E.; SAJGŐ, M.; NOLLER, H.F.; HARRIS, J. I. Amino acid sequence of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from lobster muscle. Nature (Lond), 216: 1181-1185, 1967.
46. DAVIS, B.J. Disc electrophoresis methods and application to human serum proteins. Ann.N.Y.Acad.Sci., 121: 407-427, 1964.
47. DEAL Jr., W.C. Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. IV. Nicotinamide-adenine dinucleotide dependent in vitro reversal of dissociation and possible in vivo control of yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase synthesis. Biochemistry, 8: 2795-2805, 1969.
48. DEAL, W. C. & CONSTANTINIDES, S.M. Possible control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase through NAD requirement for folding. Fed.Proc., 26:348, 1967.
49. DE VIJLDER, J.J.M. & SLATER, E.C. The reaction between NAD^+ and rabbit-muscle glyceraldehydophosphate dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta, 167:23-34, 1968.
50. DE VIJLDER, J.J.M.; HILVERS, A.G.; VAN LIS, J.M.J.; SLATER, E.C. Function and role of NAD^+ in mechanism of action of rabbit muscle glyceraldehydophosphate dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta, 191:221-228, 1969.
51. DE VIJLDER, J.J.M.; BOERS, W.; SLATER, E.C. Binding and properties of NAD^+ in glyceraldehydophosphate dehydrogenase from lobster - tail muscle. Biochim.Biophys. Acta, 191:214-220, 1969.

52. DICKERSON, R.E.; TAKANO, T.; EISENBERG, D.; KALLAI, D. B.; SAMSON, L.; COOPER, A.; MARGOLIASH, E. Ferricytochrome C. I. General features of the horse and bonito proteins at 2,8 Å resolution. J.Biol.Chem., 246:1511-1535, 1971.
53. DUGGLEBY, R.G. & DENNIS, D.T. Nicotinamide adenine dinucleotide - specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Purification and characterization. J.Biol.Chem., 249:162-166, 1974.
54. _____. Nicotinamide adenine dinucleotide - specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Assay and steady state kinetics. J.Biol.Chem., 249:167-174, 1974.
55. EBY, D. & KIRTLEY, M.E. Isolation and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte membranes. Arch.Biochem.Biophys., 198:608-613, 1979.
56. ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch.Biochem.Biophys., 82:70-77, 1959.
57. ELODI, O. & SZORENYI, E. Crystallization and comparative studies of D-3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase from muscle of various mammals. Acta.Physiol. Acad. Sci.Hung., 9:339-350, 1965.
58. FERDINAND, W. The isolation and specific activity of rabbit muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. Biochem.J., 92:578-585, 1964.
59. FERGUSON, A. Higher-category systematics. In: _____. Biochemical systematics and evolution. Glasgow. Blackie.

1980. p.131-150.

60. FOUCAULT, G.; NAKANO, M.; PUDLES, J. Role of lysine-183 in D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Eur.J. Biochem., 83:113-123, 1978.
61. FOUCAULT, G.; BODO, J.M.; NAKANO, M. Structure and reactivity relationship in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Dinitrophenylation of cysteine residues of yeast and rabbit muscle enzymes. Eur.J.Biochem., 119: 625-632, 1981.
62. FRANCIS, S.H.; MERIWETHER, B.P.; PARK, J.H. Interaction between adenine nucleotides and 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase. I. Inhibition of the hydrolysis of S-acetyl-enzyme intermediate in the esterase activity. J. Biol.Chem., 246:5427-5432, 1971.
63. _____. Effects of photooxidation of histidine-138 on the various catalytic activities of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 12:346-355, 1973.
64. FUJITA, S.C.; OSHIMA, T.; IMAHORI, K. Purification and properties of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, strain HB 8. Eur.J.Biochem., 64:57-68, 1976.
65. FURFINE, C.S. & VELICK, S.F. The acyl-enzyme intermediate and the kinetic mechanism of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction. J.Biol.Chem., 240: 844-855, 1965.
66. GAFNI, A. The interaction of adenine with its binding site in rabbit muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase studied by fluorescence decay. Biochem.

Biophys.Res.Comm., 86:285-292, 1979.

67. GAFNI, A. Location of age-related modifications in rat muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol.Chem., 256:8875-8877, 1981.
68. _____. Purification and comparative study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from muscles of young and old rats. Biochemistry, 20:6035-6040, 1981.
69. _____. Age-related effects in coenzyme binding patterns of rat muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 20:6041-6046, 1981.
70. GLOCK, G.E. & McLEAN, P. Levels of oxidized and reduced diphosphopyridine nucleotide and triphosphopyridine nucleotide in animal tissues. Biochem.J., 61:388 - 390, 1955.
71. GORJUNOV, A.I.; ANDREEVA, N.S.; BARANOWSKI, T.; WOLNY, M. Molecular symmetry of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its transformation during coenzyme binding. J.Mol.Biol., 69:421-426, 1972.
72. GRAVITO, R.M.; BERGER, D.; ROSSMANN, M.G. Molecular asymmetry in an abortive ternary complex of lobster glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 16:4393-4398, 1977.
73. GREEN, D.E.; NEEDHAM, D.M.; DEWAN, J.G. Dismutations and oxireductions. Biochem.J., 31:2327-2352, 1937.
74. GREENE, F.C. & FEENEY, R.E. Properties of muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from cold adapted antarctic fish *Dissostichus mawsoni*. Biochim. Biophys.

Acta, 220:430-442, 1970.

75. GRISSON, F.E. & KAHN, J.S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Euglena gracilis*. Arch.Biochem. Biophys., 171:444-458, 1975.
76. HANSON, K.R. Conformationally distinct subunits in protein oligomers with dihedral symmetry. J.Mol. Biol., 38:133-136, 1968.
77. HARADA, K. & WOLFE, R.G. Malic dehydrogenase. VI. A kinetic study of hydroxymalonate inhibition. J. Biol. Chem., 243:4123-4130, 1968.
78. _____. Malic dehydrogenase. VII. The catalytic mechanism and possible role of identical protein subunits. J. Biol.Chem., 243:4131-4137, 1968.
79. HARRIGAN, P.J. & TRENTHAM, D.R. Reactions of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with chromophoric thiol reagents. Biochem.J., 124:573-580, 1971.
80. _____. Kinetic studies of the acylation of pig muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by 1-3-diphosphoglycerate and of proton uptake and release in the overall enzyme mechanism. Biochem.J., 135:695-703, 1973.
81. HARRINGTON, W.F. & KARR, G.M. Subunit structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Mol. Biol., 13:885-893, 1965.
82. HARRIS, I.; MERIWETHER, B.P.; PARK, J.H. Chemical nature of the catalytic sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Nature (Lond), 198:154-157, 1963.

83. HARRIS, J.I. & PERHAM, R.N. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. I. The protein chains in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle. J. Mol. Biol., 13:876-884, 1965.
84. HARRIS, J.I. & POLGÅR, L. Amino acid sequence around a reactive lysine in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Mol. Biol., 14:630-633, 1965.
85. HARRIS, J. & PERHAM, R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle. Nature (Lond), 219:1025-1028, 1968.
86. HARRIS, J.I. & WATERS, M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: BOYER, P.D. ed. Oxidation-Reduction; Part C: Dehydrogenase (II) Oxidases (II) Hydrogen peroxide Cleavage. 3.ed. New York, Academic, 1976. p. 1-49. (The Enzymes, 13).
87. HOCKING, J.D. & HARRIS, J.I. Purification by affinity chromatography of thermostable glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Thermus aquaticus*. FEBS Lett., 34:280-284, 1973.
88. HOOD, W. & CARR, N.G. A single glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase active with NAD and NADP in *Anabaena variabilis*. Biochim. Biophys. Acta, 146:309-311, 1967.
89. HORECKER, B.L. & KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem., 175:385-390, 1948.
90. INAGAKI, M. Denaturation and inactivation of enzyme proteins. XI. Inactivation and denaturation of glutamic acid dehydrogenase by urea and the effect of its co-

enzyme on these processes. J.Biochem., 46:893 - 901, 1959.

91. INSTRUCTIONS for cellogel electrophoresis of serum proteins. Milano, Chemetron, s.d. 2p.
92. JENKINS, W.T.; YPHANTIS, D.A.; SIZER, I.W. Glutamic aspartic transaminase. I. Assay, purification and general properties. J.Biol.Chem., 234:51-57, 1959.
93. JONES, G.M.T. & HARRIS, J.I. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: amino acid sequence of enzyme from baker's yeast. FEBS Lett., 22:185-189, 1972.
94. JÖRVALL, H. Partial similarities between yeast and liver alcohol dehydrogenases. Proc.Nat.Acad.Sci. USA., 70:2295-2298, 1973.
95. KELLERSHOHN, N. & SEYDOUX, F.J. Functional asymmetry of tetrameric glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the transient kinetics of reductive dephosphorylation of 1,3 diphosphoglycerate. Biochemistry, 18:2465-2470, 1979.
96. KIRSCHNER, K.; EIGEN, M.; BITTMAN, R.; VOIGT, B. The binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: temperature-jump relaxation studies on the mechanism of an allosteric enzyme. Proc.Nat.Acad.Sci.USA., 56: 1661-1667, 1966.
97. KIRSCHNER, K.; GALLEG0, E.; SCHUSTER, I.; GOODALL, D. Co-operative binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. I. Equilibrium and temperature-jump studies

at pH 8.5 and 40°C. J.Mol.Biol., 58:29-50, 1971.

98. KIRSCHNER, K. Co-operative binding of nicotinamide adenine dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. II. Stopped-flow studies at pH 8.5 and 40°C. J.Mol.Biol., 58:51-68, 1971.
99. KOCHMAN, M. & RUTTER, W.J. The similarity of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isolated from rabbit brain and muscle. Biochemistry, 7: 1671-1677, 1968.
100. KOLB, E. & HARRIS, J.I. Purification and properties of glycolytic cycle enzymes from Coelacanth (*Latimeria chalumnae*) muscle. Biochem.J., 130: 26P, 1972.
101. KOSHLAND Jr., D.E.; NÉMETHY, G.; FILMER, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochemistry, 5:365-385, 1966.
102. KOSOWER, E.M. Additions to pyridinium rings. III. Chemical and biochemical implications of charge-transfer complex intermediates. J.Am.Chem.Soc., 78: 3497-3501, 1956.
103. _____. The effect of solvent on spectra. II. Correlation of spectral absorption data with z-values. J.Am.Chem.Soc., 80:3261-3270, 1958.
104. _____. On the mechanism of the ethanol-diphosphopyridine nucleotide reaction. Biochim.Biophys.Acta, 56:474-479, 1962.
105. KREBS, E.G.; RAFTER, G.W.; JUNGE, J.M. Yeast glyceral-

dehyde-3-phosphate dehydrogenase. II. Yeast protein. J.Biol.Chem., 200:479-492, 1953.

106. KREBS, E.G. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from yeast. In: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. eds. Preparation and Assay of Enzymes. New York, Academic, 1955, p.407-411 (Methods in Enzymology, 1).
107. KREBS, H.; RUDOLPH, R.; JAENICKE, R. Influence of coenzyme on the refolding and reassociation in vitro of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from yeast. Eur.J.Biochem., 100:359-364, 1979.
108. KRIMSKY, I. & RACKER, E. Acyl derivatives of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Science, 122: 319-321, 1955.
109. KRUSTEVA, N.; GEORGIEVA, M.; TOMOVA, N. Purification, molecular weight and subunit structure of NAD (NADP) dependent GPDH from *Chlorella*. Biokhimiya, 46: 1740-1747, 1981.
110. KUCHLER, R.J. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H.; STANFEER, J.F. eds. Manometric and Biochemical Techniques. 5.ed. Minneapolis, Burgess, 1972. p.342-356.
111. LAMBERT, J.M. & PERHAM, R.N. A comparison of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from ox muscle and liver. FEBS Lett., 40:305-308, 1974.
112. LEBHERZ, H.G. & RUTTER, W.J. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase variants in phylogenetically diverse organisms. Science, 157:1198-1200, 1967.

113. LEVITZKI, A. Ligand induced half-of-the-sites reactivity in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem.Biophys. Res.Comm., 54:889-893, 1973.
114. _____. Half-of-the-sites and all-of-the-sites reactivity in rabbit muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J.Mol.Biol., 90:451-458, 1974.
115. LYDDIATT, A.; PEACOCK, D.; BOULTER, D. Evolutionary change in invertebrate cytochrome c. J.Mol.Evol., 11: 35-45, 1978.
116. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of the enzyme dissociation constants. J.Am.Chem.Soc., 56:658-666, 1934.
117. LIPMANN, F. Acetyl phosphate. Adv.Enzymol, 6: 231 - 267, 1946.
118. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGHT, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-275, 1951.
119. LOWRY, O.H. & PASSONNEAU, J.V. The relationships between substrates and enzymes of glycolysis in brain. J. Biol.Chem., 239:31-42, 1964.
120. MacQUARRIE, R.A. & BERNHARD, S.A. Subunit conformation and catalytic function in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Mol.Biol., 55:181-192, 1971.
121. MAGAR, M.E. Optical rotatory dispersion of aldolase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 242:2517-2531, 1967.

122. MALHOTRA, O.P. & BERNHARD, S.A. Spectrophotometric identification of an active site-specific acyl glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. The regulation of its kinetic and equilibrium properties by coenzyme. J.Biol.Chem., 243:1243-1252, 1968.
123. _____. Activation of a covalente enzyme-substrate bond by noncovalent interaction with an effector. Proc. Nat. Acad.Sci.USA., 70:2077-2081, 1973.
124. MATHEW, E.; MERIWETHER, B.P.; PARK, J.H. The enzymatic significance of S-acetylation and N-acetylation of 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase. J.Biol. Chem., 242:5024-5033, 1967.
125. McDANIEL, C.F. & KIRTLEY, M.E. The interaction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase with human erythrocyte membranes. J.Biol.Chem., 249:6478-6485, 1974.
126. MELANDRI, B.A.; PUPILLO, P.; BACCARINI-MELANDRI, A. D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in photosynthetic cells. I. The reversible light-induced activation in vivo of NADP-dependent enzyme and its relationship to NAD-dependent activities. Biochim.Biophys. Acta, 220:178-189, 1970.
127. MILLS, G.C. & HILL, F.L. Metabolic control mechanisms in human erythrocytes. The role of glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. Arch.Biochem.Biophys., 146:306-311, 1971.
128. MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J.P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J.Mol.Biol., 12:88-118, 1965.

129. MORAS, D.; OLSEN, K.W.; SABESAN, M.N.; BUEHNER, M.; FORD, G.C.; ROSSMANN, M.G. Studies of asymmetry in the three dimensional structure of lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 250: 9137-9162, 1975.
130. MROSS, G.A. & DOOLITTLE, R.F. Amino acid sequence studies on artiodactyl fibrinopeptides. II. Vicuna, elk, muntjak, pronghorn antelope and water buffalo. Arch. Biochem.Biophys., 122:674-684, 1967.
131. MURDOCK, A.L. & KOEPPE, O.J. The content and action of diphosphopyridine nucleotide in triosephosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 239:1983-1988, 1964.
132. MURTHY, M.R.N.; GARAVITO, R.M.; JOHNSON, J.E.; ROSSMANN, M.G. Structure of lobster apo-D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 3,0 Å resolution. J.Mol.Biol., 138:859-872, 1980.
133. NAGRADOVA, N.K. & ASRYANTS, R.A. Essential arginine residues in D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta, 386:365-368, 1975.
134. NAGRADOVA, N.K.; SAFRONOVA, M.I.; BARATOVA, L.A.; BELIANOVA, L.P. Structural studies on glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase from rat skeletal muscle. Biochim.Biophys.Acta, 532:1-5. 1978.
135. NAKANO, M.; FOUCAULT, G.; PUDLES, J. Relationship between structure and chemical reactivity in D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Trinitrophenylation of the lysine residues in yeast, sturgeon and rabbit muscle enzymes. J.Mol.Biol., 105:275-291, 1976.

136. NEEDHAM, D.M. & PILLAI, R.K. Coupling of dismutations with esterification of phosphate in muscle. Nature, 140:64-65, 1937.
137. NYGAARD, A.P. & SUMNER, J.B. D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a comparison with liver aldehyde dehydrogenase. Arch.Biochem.Biophys., 39:119-128, 1952.
138. O'BRIEN, M.J.; EASTERBY, J.S.; POWLS, R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Scenedesmus obliquus*. Effects of dithiothreitol and nucleotide on coenzyme specificity. Biochim.Biophys.Acta, 481:348-358, 1977.
139. OGUCHI, M.; MERIWETHER, B.P.; PARK, J.H. Interaction between adenosine triphosphate and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. III. Mechanism of action and metabolic control of the enzyme under simulated in vivo conditions. J.Biol.Chem., 248:5562-5570, 1973.
140. OGUCHI, M.; GERTH, E.; FITZGERALD, B.; PARK, J.H. Regulation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by phosphocreatine and adenosine triphosphate. IV. Factors affecting in vivo control of enzymatic activity. J.Biol.Chem., 248:5571-5576, 1973.
141. OLSON, E.J. & PARK, J.H. Studies on the mechanism and active site for the esterolytic activity of 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase. J.Biol.Chem., 239:2316-2327, 1964.
142. ORSI, B.A. & CLELAND, W.W. Inhibition and kinetic mechanism of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 11:102-109, 1972.

- 143 ORSNTEIN, L. Disc electrophoresis, I. Background and theory. Ann.N.Y.Acad.Sci., 121:321-349, 1964.
- 144 ORTEC Incorporation. Model 4200. Electrophoresis system user's manual. Oak Ridge, Tenn., 1969.
- 145 PARKER, D.J. & ALLISON, W.S. The mechanism of inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by tetrathionate, o-iodosobenzoate and iodine monochloride. J.Biol.Chem., 244:180-189, 1969.
- 146 PECZON, B.D. & SPIVEY, H.O. Catalytic sites in rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Their number and their kynetic and spectral properties. Biochemistry, 11:2209-2217, 1972.
- 147 PERHAM, R.N. & HARRIS, J.I. Amino acid sequences around the reactive cysteine residues in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Mol.Biol., 7:316-320, 1963.
- 148 PIHL, A. & LANGE, R. The interaction of oxidized glutathionate, cystamine monosulfoxide, and tetrathionate with the -SH groups of rabbit muscle D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 237: 1356-1362, 1962.
- 149 POLGÁR, L. The effect of coenzyme on the S→N acyl migration in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta, 118:276-284, 1966.
- 150 RACKER, E. & KRIMSKY, I. The mechanism of oxidation of aldehydes by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 198:731-743, 1942.
- 151 RACKER, E.; KLYBAS, V.; SCHRAMM, M. Tetrose diphospha-

- te, a specific inhibitor of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 234:2510-2516, 1959.
152. RAPKINE, L. Sulphydryl groups and enzymic oxido-reduction. Biochem.J., 32:1729-1739, 1938.
 153. RAIJMAN, L. & GRISOLIA, S. New aspects of acetylglutamate action. Cold inactivation of frog carbamyl phosphate synthetase. Biochem.Biophys.Res.Comm., 4:262-265, 1961.
 154. REISLER, E.; TAUBER-FINKELSTEIN, M.; SHALTIEL, S. Evidence for an interprotomerial active site in D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. FEBS Lett., 54:315-318, 1975.
 155. REISS, U. & ROTHSTEIN, M. Heat-labile isozymes of isocitrate lyase from aging *Turbatrix aceti*. Biochem.Biophys.Res.Comm., 61:1012-1016, 1974.
 156. _____. Age-related changes in isocitrate lyase from the free living nematode *Turbatrix aceti*. J.Biol. Chem., 250:826-830, 1975.
 157. REISS, U. & GERSHON, D. Rat-liver superoxide dismutase. Purification and age-related modifications. Eur. J. Biochem., 63:617-623, 1976.
 158. ROSENBERG, L.L. & ARNON, D.I. The preparation and properties of a new glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from photosynthetic tissues. J.Biol.Chem., 217:361-371, 1955.
 159. ROSSMANN, M.G.; ADAMS, M.J.; BUEHNER, M.; FORD, G. C.;

- HACKERT, M.L.; LILJAS, A.; RAO, S.T.; BANASZAK, L.J.; HILL, E.; TSERNOGLOU, D.; WEBB, L. Molecular symmetry axes and subunit interfaces in certain dehydrogenases. J.Mol.Biol., 76:533-537, 1973.
160. SALEEMUDDIN, M. & ZIMMERMANN, U. Use of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-depleted human erythrocyte ghosts as specific high affinity adsorbents for the purification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from various tissues. Biochim.Biophys.Acta, 527: 182-192, 1978.
161. SALEMME, F.R.; KRAUT, J.; KAMEN, M.D. Structural bases for function in cytochrome c. An interpretation of comparative x-ray and biochemical data. J.Biol.Chem., 248:7701-7716, 1973.
162. SCHULMAN, M.D. & GIBBS, M. D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of higher plants. Plant Physiol., 43: 1805-1812, 1968.
163. SEGAL, H.L. & BOYER, P.D. The role of sulfhydryl groups in the activity of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 204:265-281, 1953.
164. SEYDOUX, F.; BERNHARD, S.; PFENNINGER, O.; PAYNE, M.; MALHOTRA, O.P. Preparation and active site specific properties of sturgeon muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 12:4290-4300, 1973.
165. SHALTIEL, S. Thiolysis of some dinitrophenyl derivatives of amino acids. Biochem.Biophys.Res.Comm., 29: 178-183, 1967.
166. SHALTIEL, S. & SORIA, S. Dinitrophenylation and thioly-

- sis in the reversible labeling of a cysteine residue associated with the nicotinamide-adenine dinucleotide site of rabbit muscle glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 8:4411-4415, 1969.
167. SHALTIEL, S. & TAUBER-FINKELSTEIN, M. Reversible dinitrophenylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Identification of labeled site. FEBS Lett., 8:345-348, 1970.
 168. _____. Introduction of an intramolecular crosslink at the active site of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem.Biophys.Res.Comm., 44:484-490, 1971.
 169. SHARMA, H.K.; GUPTA, S.K.; ROTHSTEIN, M. Age-related alteration of enolase in the free-living nematode. *Turbatrix aceti*. Arch.Biochem.Biophys., 174:324-332, 1976.
 170. SHARMA, H.K. & ROTHSTEIN, M. Age-related changes in the properties of enolase from *Turbatrix aceti*. Biochemistry, 17:2869-2876, 1978.
 171. SHIFRIN, S. Charge transfer and excitation-energy transfer in a model for enzyme-coenzyme interactions. Biochim.Biophys.Acta, 81:205-213, 1964.
 172. SIGMA CHEMICAL COMPANY. SDS Molecular Weight Markers. Tech.Bull. (MWS-877):1-4, 1977.
 173. _____. β -Diphosphopyridine nucleotide; assay data. St. Louis, s.d. 1p.
 174. SINGLETON Jr., R.; KIMMEL, J.R.; AMELUNXEN, R.E. The amino acid composition and other properties of thermostable glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from

Bacillus stearothermophilus. J.Biol.Chem., 244: 1623-1630, 1969.

175. SMITH, C.M. & VELICK, S.F. The Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases of liver and muscle. Cooperative interactions and conditions for functional reversibility. J.Biol.Chem., 247:273-284, 1972.
176. SPERANZA, M.L. & GOZZER, C. Purification and properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves. Biochim.Biophys.Acta, 522: 32-42, 1978.
177. STALLCUP, W.B. & KOSHLAND Jr., D.E. Half-of-the-sites reactivity and negative co-operativity: the case of yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J.Mol.Biol., 80:41-62, 1973.
178. _____. Reactive lysine of yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Attachment of a reporter group to a specific non-essential residue. J.Mol.Biol., 80: 63-75, 1973.
179. _____. Half-of-the-sites reactivity in the catalytic mechanism of yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J.Mol.Biol., 80:77-91, 1973.
180. STANCEL, G.M. & DEAL Jr., W.C. Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. V. Dissociation of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase into subunits by ATP. Biochem.Biophys.Res.Comm., 31: 398-403, 1968.
181. _____. Reversible dissociation of yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by adenosine triphosphate. Bio-

chemistry, 8:4005-4011, 1969.

182. STEWART, J.M. & YOUNG, J. Solid Phase Peptide Synthesis. San Francisco. W.H. Freeman, 1969, 103 p.
183. SUZUKI, K. & HARRIS, J.I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. FEBS Lett., 13:217-220, 1971.
184. SUZUKI, K. & IMAHORI, K. Isolation and some properties of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from vegetative cells of *Bacillus cereus*. J.Biochem., 73:97-106, 1973.
185. TAYLOR, J.F. & LOWRY, C. The molecular weights of some crystalline enzymes from muscle and yeast. I. aldolase and D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta, 20:109-117, 1956.
186. THOMAS, K.A. & SCHECHTER, A.N. Protein folding. Evolutionary, structural, and chemical aspects. In: GOLDBERGER, R.F. ed. Biological regulation and development. New York, Plenum Press, 1980. v.2. p.43-100.
187. TRENTHAM, D.R. Aspects of chemistry of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem.J., 109:603-612, 1968.
188. _____. Reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase facilitated by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. Biochem.J., 122:59-69, 1971.
189. _____. Rate-determining processes and the number of simultaneously active sites of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Biochem.J., 122:71-77, 1971.

190. TUCKER, D. & GRISOLIA, S. Some stability effects of ATP, Mg^{++} and dinitrophenol on actomyosin and myosin adenosinetriphosphatase. Biochem.Biophys.Res.Comm., 3: 346-349, 1960.
191. _____. Inactivation of muscle triosephosphate dehydrogenase by reduced diphosphopyridine nucleotide at physiological concentrations. J.Biol.Chem., 237: 1068 - 1073, 1962.
192. VELICK, S.F. Coenzyme binding and thiol groups of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Biol. Chem., 203:563-573, 1953.
193. VELICK, S.F. & FURFINE, C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: BOYER, P.D.; LARDY, H.; MYRBÄCK, K. eds. Oxidation and Reduction; Part A: Nicotinamide Nucleotide-linked enzymes. Flavin nucleotide-linked enzymes. 2 ed. New York, Academic, 1963, p.243 - 273. (The Enzymes, 7).
194. VESTERBERG, O. Staining of protein zone after isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Biochim. Biophys.Acta, 243:345-348, 1971.
195. _____. Isoelectric focusing of proteins. In: JAKOBY, W. B. ed. Enzyme purification and related techniques. New York, Academic, 1971, p.389-412, (Methods in Enzymology, 22).
196. VON ELLENRIEDER, G.; KIRSCHNER, K.; SCHUSTER, I. The binding of oxidized and reduced nicotinamide adenine-dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Eur.J.Biochem., 26:220-236, 1972.

197. WANG, C.S. & ALAUPOVIC, P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte membranes. Kinetic mechanism and competitive substrate inhibition by glyceraldehyde 3-phosphate. Arch.Biochem.Biophys., 205: 136-145, 1980.
198. WARBURG, O. & CHRISTIAN, H. Isolierung und kristallisation des garungs ferments enolase. Biochem.Z., 310: 384-421, 1941.
199. WASSARMAN, P.M.; WATSON, H.C.; MAJOR, J.P. Reaction of the sulphydryl groups of lobster-muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with organic mercurials. Biochim.Biophys.Acta, 191:1-9, 1969.
200. WATSON, H.C. & BANASZAK, I.J. Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Nature, 204:918 -920, 1974.
201. WEBER, K. & ORBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem., 244:4406-4412, 1969.
202. WILLIAMSON, J.R. Glycolytic control mechanisms. I. Inhibition of glycolysis by acetate and pyruvate in the isolated, perfused rat heart. J.Biol.Chem., 240:2308-2321, 1965.
203. YANG, S.T. & DEAL Jr., W.C. Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. VI. Competitive inhibition of yeast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by cyclic adenosine monophosphate, adenosine triphosphate and other adenine-containing compounds. Biochemistry, 8:2806-2813, 1969.

204. YONUSCHOT, G.R.; ORTWERTH, B.J.; KOEPPE, O.J. Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-requiring glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves. J.Biol.Chem., 245: 4193-4198, 1970.